

**UNTERSUCHUNG EINES VEREINFACHTEN MODELLS DES
ZEITVERHALTENS DER RETINALEN AUTOFLUORESZENZ
HINSICHTLICH DER DATENQUALITÄT UND DIAGNOSTISCHEN
AUSSAGEKRAFT**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr.med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Franziska Schuster

geboren am 10. Dezember 1993 in Memmingen

Gutachter:

1. PD Dr. med. Regine Augsten, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Michael Börsch, Universitätsklinikum Jena
3. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Karsten König, Universität des Saarlandes

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.01.2019

Diese Dissertation wurde durch ein Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena gefördert.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....	I
Zusammenfassung	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Fluoreszenz.....	1
1.1.1 Grundlagen	1
1.1.2 Endogene Fluorophore des Augenhintergrundes	3
1.1.3 Charakterisierung von Fluorophoren anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauern.....	7
1.2 Fluoreszenzlebensdauerophthalmoskopie (FLIO).....	9
1.2.1 Prinzipien und Technik der FLIO.....	9
1.2.2 Anwendungsbereiche der FLIO	11
1.3 Diabetische Retinopathie.....	13
1.3.1 Ätiologie	13
1.3.2 Bildgebung bei diabetischer Retinopathie	14
1.3.3 Fluoreszenzlebensdauern bei diabetischer Retinopathie.....	15
2 Ziele der Arbeit	16
3 Methodik.....	18
3.1 FLIO-Aufnahmen an Patienten mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie und gesunden Kontrollen	18
3.1.1 Testgruppen.....	18
3.1.2 Triexponentielle Approximation des Fluoreszenzzerfalls	19
3.2 Vereinfachtes Modell des Fluoreszenzzerfalls für die klinische Anwendung ...	22
3.2.1 Grundlagen des vereinfachten Modells.....	22
3.2.2 Berechnung von altersnormierten Fluoreszenzlebensdauern	23
3.3 Statistische Auswertungen	24

3.3.1 Vergleich der mathematischen Modelle des Fluoreszenzzerfalls.....	24
3.3.2 Vergleich von Kontroll- und Patientengruppe.....	25
4 Ergebnisse.....	26
4.1 Ergebnisse zur Berechnung altersnormierter Fluoreszenzlebensdauern	26
4.2 Vergleich beider mathematischer Modelle zur Approximation des Fluoreszenzzerfalls	28
4.2.1 gesamte Kontrollgruppe.....	28
4.2.2 Patientengruppe.....	32
4.3 Vergleich der mathematischen Modelle des Fluoreszenzzerfalls hinsichtlich der Trennung von Patienten und Kontrollen	33
4.3.1 Vergleich beider Approximationsverfahren hinsichtlich einer möglichen Trennung von Kontroll- und Patientengruppe durch einzelne Parameter	33
4.3.2 Trennung beider Gruppen durch eine logistische Regression	37
5 Diskussion	39
5.1 Erkenntnisse aus dem vereinfachten Modell des Fluoreszenzzerfalls	40
5.1.1 Vergleich mit bekannten Ergebnissen.....	40
5.1.2 Möglichkeit der Trennung der Patientengruppe mit NPDR von einer gesunden Referenzgruppe	41
5.1.3 Einfluss auf die Ortsauflösung der FLIO-Aufnahmen.....	42
5.2 Limitationen und Grenzen	45
5.2.1 Limitationen der Fluoreszenzlebensdauerophthalmoskopie	45
5.2.2 Grenzen des vereinfachten Datenmodells	46
5.3 Ausblick	49
6 Schlussfolgerungen	50
7 Literaturverzeichnis	52
8 Anhang	59
8.1 Statistische Daten	59
8.1.1 Vergleich variable – fixierte Lebensdauern Patientengruppe	59
8.1.2 Vergleich Kontrollen – Patienten variable Lebensdauern	60

8.1.3 Fläche unter der Kurve	61
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	62
8.3 Tabellenverzeichnis.....	64
8.4 Danksagung	65
8.6 Ehrenwörtliche Erklärung	66

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

a	Alter des Probanden zum Zeitpunkt der Untersuchung
A2E	N-Retinylden-N-Retinyl-Ethanolamin
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
α	Relative Amplitude (%) der Fluoreszenzlebensdauer
$\alpha_1/\alpha_2/\alpha_3$	Relative Anteile an der Gesamtfluoreszenz (%)
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (englisch: <i>area under the curve</i>)
c	Zentralregion der ETDRS-Grid (<i>central</i>)
Ch1	Kanal 1, kurzwelliger Spektralkanal (498-560 nm)
Ch2	Kanal 2, langwelliger Spektralkanal (560-720 nm)
DR	Diabetische Retinopathie
ETDRS	<i>early treatment diabetic retinopathy study</i>
FAD	Oxidierter Form des Flavin-Adenin-Dinukleotids
FADH ₂	Reduzierter Form des Flavin-Adenin-Dinukleotids
FAF	Fundusautofluoreszenz
FLIO	Fluoreszenzlebensdauerophthalmoskopie
HbA _{1c}	Frühes Glykosylierungsprodukt des Hämoglobins
IC	<i>Internal Conversion</i>
IOL	Intraokularlinse

ir	Region des inneren Rings der ETDRS-Grid (<i>inner ring</i>)
IRF	<i>Instrument Response Function</i>
μm	Mikrometer
NAD ⁺	Oxidierte Form des Nikotinamid-Adenin-Dinukleotids
NADH	Reduzierte Form des Nikotinamid-Adenin-Dinukleotids
NADH-LDH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Laktatdehydrogenase
nm	Nanometer
NPDR	Nichtproliferative diabetische Retinopathie
ns	Nanosekunden
OCT	Optische Kohärenztomographie
or	Region des äußeren Rings der ETDRS-Grid (<i>outer ring</i>)
ps	Picosekunden
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RPE	Retinales Pigmentepithel
S ₀ /S ₁	Singulett-Zustand
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis (englisch: <i>signal-to-noise-ratio</i>)
T ₀ /T ₁	Triplett-Zustand
τ	Fluoreszenzlebensdauer (ps)
T ₁ /T ₂ /T ₃	Komponenten der Fluoreszenzlebensdauer (ps)
T _m	Amplitudengewichtete, mittlere Fluoreszenzlebensdauer (ps)
TCSPC	Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (englisch: <i>time-correlated single photon counting</i>)
X _R ²	Reduziertes Chi-Quadrat

Zusammenfassung

Die Fluoreszenzlebensdauerophthalmoskopie (FLIO) ist eine neue, nichtinvasive Methode, die zur Darstellung der Retina neben der Fluoreszenzintensität auch die Abklingzeiten einzelner Fluorophore nutzbar macht (Schweitzer et al. 2002, Klemm et al. 2015). Fluorophoren können charakteristische Lebenszeiten zugeordnet werden. Diese sind unabhängig von ihrer Konzentration und der Intensität, verändern sich jedoch abhängig von ihrer Umgebung (Lakowicz 2006, Marcu 2012, Becker 2012a). Die FLIO hat Potential, zur frühzeitigen Diagnostik bei Erkrankungen des Augenfundus und zur Grundlagenforschung von Stoffwechselveränderungen verwendet zu werden. Bei verschiedenen retinalen Erkrankungen wurden Veränderungen der Fluoreszenzlebensdauern beobachtet (Schweitzer et al. 2010, Dysli et al. 2015, Jentsch et al. 2015, Dysli et al. 2016a, Dysli et al. 2016b, Sauer et al. 2017b). Auch bei der nichtproliferativen diabetischen Retinopathie (NPDR) war dies zu sehen (Schmidt et al. 2017). Da die diabetische Retinopathie einer der häufigsten Gründe der Erblindung in den Industrienationen ist, wäre eine routinemäßige Untersuchung, die Frühzeichen dieser Erkrankungen messen kann, erstrebenswert. Erste Ergebnisse deuten auf die FLIO als vielversprechende Methode, insbesondere im Bereich der Früherkennung, hin (Schweitzer et al. 2002, Schweitzer et al. 2011).

Die vorliegende Doktorarbeit soll durch die Entwicklung eines vereinfachten Datenmodells einen Beitrag zur klinischen Anwendbarkeit der FLIO leisten. Mit Hilfe dieses Modells können die Lebensdauern $\tau_{1...3}$ vor dem Approximationsverfahren festgelegt werden. Zu dessen Entwicklung wurden FLIO-Aufnahmen einer gesunden Kontrollgruppe ($n = 92$) ausgewertet. Nach der Approximation zeigte sich eine lineare Abhängigkeit der Lebensdauern vom Alter. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden Gleichungen erstellt, durch die sich altersentsprechende Lebensdauern berechnen lassen, die anschließend vor der triexponentiellen Approximation fixiert werden können. Zur Untersuchung der möglichen Diskrimination bei Verwendung des vereinfachten Datenmodells wurde eine Patientengruppe aus 34 Personen mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie im Vergleich zu einer altersangepassten Kontrollgruppe ($n = 48$) betrachtet.

Grundsätzlich liefert das vereinfachte Datenmodell verwendbare Ergebnisse. Die Anzahl der zu analysierenden Parameter wurde reduziert, wobei die Verbleibenden gleichzeitig für die Diagnostik nutzbar gemacht werden sollen. Im bisherig verwendeten Modell zeigte sich eine hohe Abhängigkeit der Parameter voneinander. Diese wurde durch fixierte Zeitkonstanten gemindert. Weiterhin erlaubte die Verringerung der Zahl der zu bestimmenden Variablen eine höhere Ortsauflösung bei gleichem Signal-Rausch-Verhältnis der Messdaten. Es ist bekannt, dass eine Kombination von FLIO-Parametern in einer logistischen Regression eine Trennung von Patienten mit NPDR und Kontrollen mit hoher Sensitivität und Spezifität ermöglicht (Schmidt et al. 2017). In dem in dieser Arbeit untersuchten Modell wurde durch eine logistische Regression, bei gleichzeitiger Reduktion der einfließenden Variablen, eine Erhöhung der Trennschärfe zur Unterscheidung dieser beiden Gruppen ermöglicht (Sensitivität: 91,18 %, Spezifität: 97,92 %). Obwohl die Messwerte bei festen Lebensdauern schlechter repräsentiert wurden, was an einem erhöhten X_R^2 zu erkennen war, waren die Ergebnisse weiterhin verwendbar. Die amplitudengewichtete, mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_m wird oft in klinischen Untersuchungen angewandt. Dieser Parameter zeigte höhere absolute Werte, die jedoch hochsignifikant mit denen des herkömmlichen Modells korrelieren ($p < 0,005$). Somit ist davon auszugehen, dass bei beiden Modellen durch diese Variable gleiche klinische Aussagen getroffen werden können. Auch bei der Auswertung der relativen Anteile der einzelnen Lebensdauern an der Gesamtfluoreszenz zeigten sich hohe Korrelationskoeffizienten. Hinsichtlich der Trennung beider Testgruppen fand das Approximationsverfahren mit fixierten Lebensdauern mehr statistisch signifikante Unterschiede der Mediane aller FLIO-Parameter. Zudem konnte die Ortsauflösung verbessert werden, was eine detailliertere Darstellung des Augenfundus ermöglicht.

Um die Interpretation der Amplituden zu verbessern und deren Bedeutung bei retinalen Erkrankungen verstehen zu können, sind jedoch weitere Follow-Up-Studien notwendig. Eine triexponentielle Approximation mit fixierten Zeitkonstanten stellt sich zusammenfassend als möglich dar und es können konsistente Ergebnisse erzielt werden. Durch das in dieser Arbeit entwickelte vereinfachte Datenmodell zum Zeitverhalten der retinalen Autofluoreszenz konnte somit ein Schritt zur klinischen Anwendbarkeit der FLIO zur frühzeitigen Diagnostik bei retinalen Erkrankungen geleistet werden.

1 Einleitung

1.1 Fluoreszenz

Bereits 1845 wurde das Phänomen der Fluoreszenz beschrieben. Sir John Frederick William Herschel betrachtete bei einer Chinin-Lösung, die von Sonnenlicht angestrahlt wurde, eine wunderschöne himmlisch blaue Farbe. Er schilderte dieses Phänomen als bis dato einzigartig, welches durch ihm bekanntes Wissen nicht erklärt werden konnte (Herschel 1845). Heute weiß man, dass Fluoreszenz die Fähigkeit eines Stoffes, nach Anregung durch kurzwelliges Licht langwelligeres Licht zu emittieren, bezeichnet. Durch Absorption eines Photons treten Elektronen in den angeregten Zustand mit einem höheren Energieniveau über. Über verschiedene Wege ist eine Rückkehr in den Grundzustand möglich. Das Molekül kann entweder ein Photon emittieren, die absorbierte Energie des aufgenommenen Photons in Hitze umwandeln, die Energie an die Umgebung abgeben oder über den Triplett-Zustand T1 in den Grundzustand übergehen (Becker 2012a). Fluoreszenz ist als Methode für verschiedenste Anwendungsgebiete nicht mehr wegzudenken. Beispielhaft genannt seien Biotechnologie, DNA-Sequenzierung, medizinische Diagnostik oder Genanalyse (Lakowicz 2006).

1.1.1 Grundlagen

Moleküle können mit sichtbarem Licht interagieren. Diese Wechselwirkungen sind in Abbildung 1, dem Jablonski Diagramm, vereinfacht dargestellt. Dieses Diagramm entwickelte der Physiker Alexander Jablonski, der durch seine vielen Beiträge zum Thema der Fluoreszenzspektroskopie als deren Urvater angesehen wird.

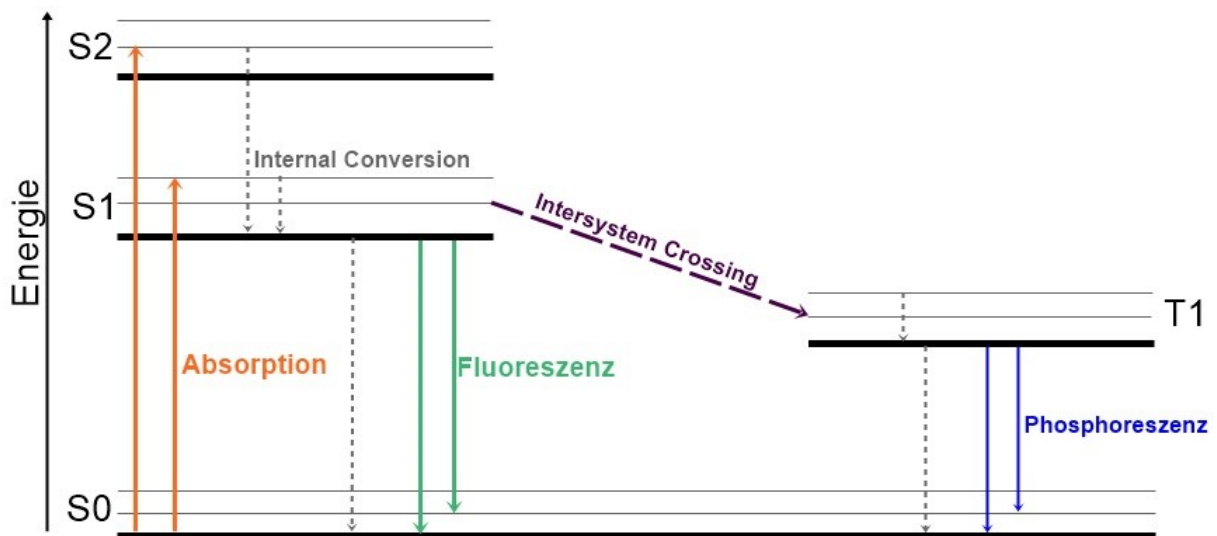


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Jablonski Diagramms, in Anlehnung an Lakowicz 2006, Seite 5 (Lakowicz 2006)

Elektronen besitzen einen Eigendrehimpuls, der im Singulett-Zustand mit $S = 0$ und im Triplett-Zustand mit $S = 1$ angegeben wird. Der Eigendrehimpuls wird durch die Spinquantenzahl s beschrieben und kann Werte von $+\frac{1}{2}$ und $-\frac{1}{2}$ annehmen. Innerhalb der beiden Zustände sind verschiedene Energieniveaus $S_{0...n}$ bzw. $T_{0...n}$ möglich. Nach Absorption der Energie eines Photons können bestimmte Moleküle unter Beibehaltung ihrer Spinorientierung in einen angeregten Zustand versetzt werden. Hierbei geht das Molekül in ein höheres Energieniveau $S_{\geq 1}$ über. Beim anschließenden Vorgang der *Internal Conversion* (IC) fällt das Molekül strahlungslos auf den niedrigsten Schwingungszustand von S_1 . Dieser spielt sich im Bereich von 10^{-12} Sekunden oder weniger ab. Der folgende Übergang auf den Grundzustand S_0 kann durch strahlende sowie strahlungslose Prozesse (IC) stattfinden. Emittiert eine Substanz in einem angeregten Zustand Licht, wird dies als Lumineszenz bezeichnet. Der *Stokes-Shift* beschreibt, dass das emittierte Licht aufgrund von Energieverlusten während der IC eine größere Wellenlänge als das Anregungslicht hat (Lakowicz 2006). Anhand der Dauer bis zu der Rückkehr in den Grundzustand können zwei Kategorien der Lumineszenz unterschieden werden. Meist erfolgt die Relaxation unter Abgabe von Fluoreszenz in den S_0 -Zustand. Diese Rückkehr spielt sich im Nanosekundenbereich ab. Seltener lässt sich die Phosphoreszenz beobachten. Moleküle, die sich im S_1 -Zustand befinden, können durch eine Änderung ihres Spins auch in den Triplett-Status T_1 übergehen. Dies wird als *Intersystem-Crossing* (ISC)

bezeichnet. Anschließend erfolgt aus dem angeregten Triplett-Zustand eine Rückkehr in den Grundzustand. Die Zerfallszeiten sind langsam und befinden sich im Millisekunden- bis Sekundenbereich, da zum Übergang in S_0 eine erneute Umkehr des Spins notwendig wird. Das Phänomen der Phosphoreszenz tritt durch Quenchprozesse in Lösung kaum auf, weshalb zur Charakterisierung einer Substanz häufiger die Beschreibung der Fluoreszenz verwendet wird. Die Emissionsspektren eines Moleküls hängen von der chemischen Struktur eines Fluorophores und von der Lösung, in der sie sich befinden, ab (Lakowicz 2006, Berezin und Achilefu 2010).

1.1.2 Endogene Fluorophore des Augenhintergrundes

Die Fluoreszenz am Augenfundus (FAF) wird durch verschiedene Fluorophore determiniert. Anhand bestimmter Eigenschaften wie des Anregungs- und Emissionsspektrums, aber auch des Fluoreszenzzerfalls ist eine Detektion und Diskrimination einzelner Fluorophore möglich. Damit erhofft man sich, genauere Aussagen über Veränderungen bei Erkrankungen des Auges treffen zu können.

Lipofuszin

Lipofuszin kommt in allen postmitotischen Zellen des Körpers vor, dahingehend auch im retinalen Pigmentepithel (RPE). Schon 1988 beschrieben Eldred und Katz Lipofuszin als das am häufigsten vorkommende Fluorophor des RPE beim Erwachsenen. Lipofuszin akkumuliert mit zunehmendem Alter, weshalb es vielfach als Alterspigment bezeichnet wird (Eldred und Katz 1988). Es entsteht zum einen durch die unvollständige Phagozytose der äußeren Segmente der Photorezeptoren, zum anderen durch Autophagozytose von geschädigten Organellen und Proteinaggregaten und akkumuliert in den Lysosomen (Boulton 2014). Der mögliche krankhafte Einfluss von Lipofuszin zeigt sich als wichtiger Faktor bei der vererbaren Stargardt-Krankheit, bei der sich massive Lipofuszin-Ansammlungen zeigen, sowie bei der vitelliformen Makuladystrophie (Feldman et al. 2015). Lipofuszin besteht aus mindestens zwanzig verschiedenen Fluorophoren (Yakovleva et al. 2017). Bei der nichtinvasiven Messung der Fundusautofluoreszenz wird das Signal größtenteils durch das Lipofuszin bestimmt (Delori 2004). Das Fluoreszenzmaximum liegt zwischen 560 und 700 nm. Durch das starke Fluoreszenzsignal des Lipofuszins können schwächere Fluoreszenzen anderer Moleküle überdeckt werden (Schweitzer

et al. 2007). Auch nach jahrelanger Forschung ist die genaue Zusammensetzung noch nicht bekannt. Der am besten untersuchte Bestandteil ist das N-Retinylid-N-Retinyl-Ethanolamin (A2E), welches lange Zeit als Biomarker für das Lipofuszin angesehen wurde. Die maximale Anregung von A2E findet sich bei 437 nm mit einer größtmöglichen Emission bei 600 nm. Es werden Lebenszeiten von 170 ps für τ_1 ($\alpha_1 = 98\%$) und 1120 ps für τ_2 ($\alpha_2 = 2\%$) angegeben (Schweitzer 2010). Nachdem Ablonczy et al. 2013 herausgefunden haben, dass A2E nicht für die Zunahme der Fluoreszenz von Lipofuszin zuständig ist, könnte die bisher vermutete Bedeutung dieses Moleküls deutlich geringer sein als angenommen und sollte deshalb kritisch betrachtet werden (Sparrow und Boulton 2005, Smith et al. 2013, Ablonczy et al. 2013).

Reduktionsäquivalente

$\text{NAD}^+ - \text{NADH}$ und $\text{FAD} - \text{FADH}_2$ sind Redoxpaare, die als Elektronentransporter bei der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien fungieren und die Umwandlung von ADP zu ATP ermöglichen. Untersucht man das Redoxpaar $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$ hinsichtlich seiner Fluoreszenz, wird alleinig die reduzierte Form NADH betrachtet, die im Gegensatz zur oxidierten Form Eigenfluoreszenz zeigt. Diese präsentiert sich vor allem bei Sauerstoffmangel des retinalen Gewebes (Schweitzer et al. 2010). NADH besitzt ein weites Anregungsspektrum mit einem Maximum bei 340 nm und seine Fluoreszenz kann bei 470 nm detektiert werden (Koenig und Schneckenburger 1994). Da eine Anregung der Fluoreszenz am Augenfundus jedoch auf Grund der Transmission durch Okularmedien lediglich bei Werten von über 400 nm möglich ist und NADH nur in einer geringen Konzentration vorliegt, ist eine Messung dieses Reduktionsäquivalentes an der Retina unwahrscheinlich. Dennoch konnte gezeigt werden, dass NADH auch bei einer Wellenlänge von 446 nm angeregt werden kann und hierbei ein Emissionsmaximum bei 510 nm zu finden ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Anregung und somit eine Messung prinzipiell möglich wäre (Schweitzer et al. 2007). Dahingegen ist durch FLIO die Unterscheidung zwischen der freien und proteingebundenen Form des NADH realisierbar, da sich die Lebensdauern deutlich unterscheiden. Freies NADH zeigt eine mittlere Lebensdauer von circa 0,4 ns, während proteingebundenes NADH abhängig vom gebundenen Protein eine mittlere Lebensdauer von bis zu 5 ns zeigt (Lakowicz 2006).

An der Retina wird aus der Gruppe der Flavine vor allem das FAD betrachtet. Die oxidierte Form zeigt ein Anregungsmaximum bei 450 nm und eine Emission bei 530 nm, während die reduzierte Form keine Fluoreszenz zeigt (Koenig und Schneckenburger 1994). FAD hat eine Lebenszeit von 2,3 ns, die sich auf Zeiten von bis zu 0,3 – 1 ns verringert, wenn es in einer proteingebundenen Form vorliegt (Lakowicz 2006). Bei Mangelversorgung mit Sauerstoff in einem Gewebe verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung des FADH₂. Da dieses Fluorophor keine Fluoreszenz zeigt, verringert sich der Beitrag des FAD zur Fluoreszenz (Dysli et al. 2015).

Kollagen und Elastin

Kollagen und Elastin sind Strukturproteine der extrazellulären Matrix und an vielen Stellen des Körpers zu finden. Am Auge wurde das Vorkommen von Elastin und vier verschiedenen Kollagenarten (I, II, III und IV) beschrieben (Ihanamaki et al. 2004). Bei sklerotischen Prozessen, die sich im Alter häufen, ist eine Vermehrung der extrazellulären Matrix zu erwarten. Die Fluoreszenz dieser Strukturproteine wird durch *Cross-Linking*-Produkte bedingt (Fujimori 1989). In Hinblick auf die Fluoreszenzintensitäten sind keine bedeutsamen Unterschiede zwischen den beschriebenen Kollagenen und Elastin zu vermerken. Bei einer Anregung von 400 nm lässt sich eine Fluoreszenz zwischen 460 und 470 nm detektieren. Durch die Messungen der Fluoreszenzlebensdauern ließen sich Differenzen feststellen. Die mittleren Lebensdauern werden folgendermaßen angegeben: Elastin: 1279 ps, Kollagen I: 1748 ps, Kollagen II: 1435 ps, Kollagen III: 1106 ps, Kollagen IV: 1619 ps (Schweitzer et al. 2007).

Advanced Glycation Endproducts (AGE)

Advanced Glycation Endproducts sind eine heterogene Gruppe aus Molekülen, die durch nicht-enzymatische Glykosylierung entstehen, welche als Maillard-Reaktion bekannt ist. Sie akkumulieren physiologisch mit der Zeit. Beim Diabetes mellitus ist diese Ablagerung jedoch auf Grund des erhöhten Glukoseangebots stark beschleunigt (Tarr et al. 2013, Chen et al. 2013). AGEs bestehen aus mehreren Fluorophoren und finden sich am Auge sowohl am Fundus als auch in anderen retinalen Strukturen, wie der Linse oder der Kornea. Sie besitzen eine maximale Anregung bei 370 nm mit einem Emissionsmaximum von 500 nm. Die Lebensdauern

werden mit $\tau_1 = 865$ ps ($\alpha_1 = 62\%$) und $\tau_2 = 4170$ ps ($\alpha_2 = 28\%$) angegeben (Schweitzer 2010).

weitere Fluorophore

Ein weiterer Fluorophor des Augenfundus ist Melanin. Melanin bestimmt, durch den Pigmentierungsgrad der Iris, die Farbe des Auges und findet sich sowohl in der Choroidea als auch im RPE. Das Emissionsmaximum liegt bei 436 nm (Anregung: 360 nm). Bei Anregungswellenlängen, die über 400 nm liegen, erhält man lediglich ein schwaches Fluoreszenzsignal. Dennoch konnten Messungen zur Lebensdauer bei einer Anregung von 446 nm durchgeführt werden, im Zuge derer eine mittlere Lebensdauer von 916 ps ermittelt wurde (Schweitzer et al. 2007).

Zu den endogenen Fluorophoren zählen darüber hinaus die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Deren aromatischen Seitenketten tragen zur Fluoreszenz der Proteine bei. Die Anregung ist jedoch lediglich im UV-Bereich (260 - 295 nm, mit Emission bei 282 – 353 nm) möglich, weswegen eine Messung über die FLIO am Augenfundus nicht möglich ist (Lakowicz 2006).

Xanthophyll, welches am Auge als Makulapigment bekannt ist, besteht aus den Karotinoiden Lutein und Zeaxanthin und findet sich in der Henle Schicht und der plexiformen Schicht der Makula (Trieschmann et al. 2008). Diese beiden Bestandteile dienen als Antioxidantien und spielen eine entscheidende Rolle bei der Protektion vor oxidativem Stress. Es ist bekannt, dass das Makulapigment die FAF-Anregung bei Wellenlängen kleiner 500 nm absorbiert und deshalb die zentrale Makula in FAF-Bildern hypofluoreszent erscheint (Sauer et al. 2015, Dysli et al. 2017). Nach Barker et al. kann das Makulapigment in einem breiten Bereich zwischen 440 - 540 nm angeregt werden und präsentiert eine maximale Fluoreszenz bei 550 nm. In Lösung zeigt sich bei Anregung mit 473 nm eine kurze Lebensdauer von unter 100 ps (Barker et al. 2011). Anhand dieser Erkenntnisse ist zu vermuten, dass die Karotinoide einen großen Beitrag zu den kurzen Lebensdauern in der Makula leisten (Sauer et al. 2015).

1.1.3 Charakterisierung von Fluorophoren anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauern

Die Fluoreszenzlebenszeit τ beschreibt die durchschnittliche Länge, die ein Molekül in seinem angeregten Zustand S_1 verbleibt, bevor es unter Emission eines Photons in den Grundzustand S_0 zurückkehrt. Dieser Zerfall ist exponentiell und spielt sich im Nano- bis Picosekundenbereich ab (Becker et al. 2004). Zusätzlich zur Emission der Fluoreszenz (Γ) kann ein strahlungsloser Übergang (k_{nr}) in S_0 auftreten. Die mittlere Lebenszeit τ wird durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1)$$

τ kann durch folgende Gleichung experimentell ermittelt werden:

$$I(t) = I_0 * e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2)$$

Die Intensität I ist die Strahlungsleistung, die sich proportional zur Anzahl der Moleküle im S_1 -Zustand verhält. Selbige wird hier in Abhängigkeit von der Zeit t gemessen. Diese Formel bezieht sich jedoch auf einen monoexponentiellen Zerfall. Da der Fluoreszenzzerfall der Retina allerdings durch eine Interaktion vieler verschiedener Fluorophore gekennzeichnet ist, muss von einem multiexponentiellen Zerfall ausgegangen werden. Um diesen zu berücksichtigen, wird eine Summengleichung verwendet:

$$\frac{I(t)}{I_0} = \sum_i^n \alpha_i * e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (3)$$

I_0 – Intensität zum Startpunkt 0, α_i – relativer Anteil einer Komponente an der Gesamtfluoreszenz zum Zeitpunkt t_0

Die Konzentration eines Fluorophores nimmt hierbei Einfluss auf den Wert α . Am Augenhintergrund findet sich ein triexponentieller Fluoreszenzzerfall. Dieser wird in Abbildung 2 zusammen mit der amplitudengewichteten, mittleren Fluoreszenzlebensdauer τ_m dargestellt. Die kürzesten Abklingzeiten entstammen dem retinalen Pigmentepithel, mittlere Lebensdauern der neuronalen Retina und die längsten Lebensdauern spiegeln die Fluoreszenz der Augenlinse wieder (Schweitzer et al. 2007, Dysli et al. 2014). A2E und proteingebundenes FAD haben den größten

Einfluss auf die Fluoreszenz des RPE, freies NADH spiegelt sich in den mittleren Lebensdauern der neuronalen Retina wieder und die längsten Lebenszeiten werden durch die Fluorophore der extrazellulären Matrix sowie AGE und protein-gebundenem NADH beeinflusst (Schweitzer 2010).

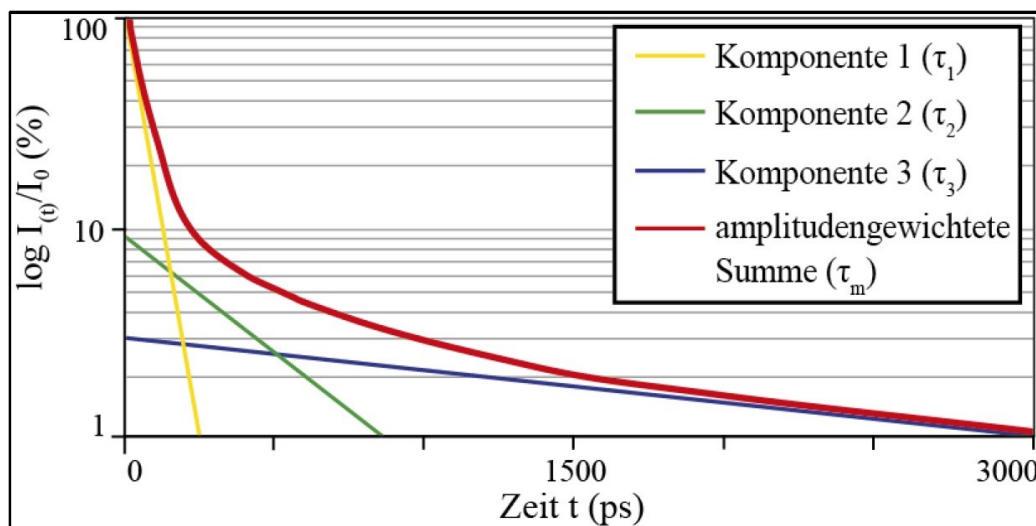


Abbildung 2: Triexponentieller Fluoreszenzzerfall in Anlehnung an Deutsch, L. (Deutsch 2011)

Anhand des Fluoreszenzzerfalls lassen sich Aussagen zu den molekularen Interaktionen eines Fluorophores mit seiner Umgebung treffen (Becker 2012a). Um die Abklingzeit der Fundusautofluoreszenz messen zu können, wurde in der Arbeitsgruppe Experimentelle Ophthalmologie des Universitätsklinikums Jena die Fluoreszenzlebensdauerophthalmoskopie (FLIO) entwickelt.

1.2 Fluoreszenzlebensdauerophthalmoskopie (FLIO)

Die Fluoreszenzlebensdauerophthalmoskopie ist eine neue, nichtinvasive Methode, die aus einer Weiterentwicklung der Fluoreszenzintensitätsmikroskopie (FLIM) hervorgegangen ist. Hierbei wird die Abklingzeit der FAF *in vivo* gemessen, die durch endogene Fluorophore des Augenfundus generiert wird (Schweitzer et al. 2002, Klemm et al. 2015). Veränderungen der Konfiguration eines Moleküls oder seiner Einbettungsmatrix können zu veränderten FAF-Lebenszeiten führen. Faktoren wie der pH, die Viskosität oder die Temperatur können diese beeinflussen. Als Vorteil dieser Untersuchungsmethode ist zu nennen, dass die Fluoreszenzlebenszeit eines Fluorophores praktisch unabhängig von seiner Konzentration (Becker 2012a) und seiner Fluoreszenzintensität ist (Lakowicz 2006, Marcu 2012). Es ist jedoch eine ausreichende Photonenanzahl notwendig, um aus dem Fluoreszenzzerfall mehrere Lebensdauern zu bestimmen. Durch charakteristische Abklingzeiten wird eine Verfälschung der Ergebnisse durch Überlagerung verschiedener Fluorophore und die alleinige Beurteilung anhand der Fluoreszenzspektren verhindert (Schweitzer et al. 2002). Bisher ist die FLIO nur in klinisch-experimentellen Studien eingesetzt worden. Das Ziel derzeitiger intensiver Forschungen ist es jedoch, die Technik der klinischen Routineanwendung näher zu bringen.

1.2.1 Prinzipien und Technik der FLIO

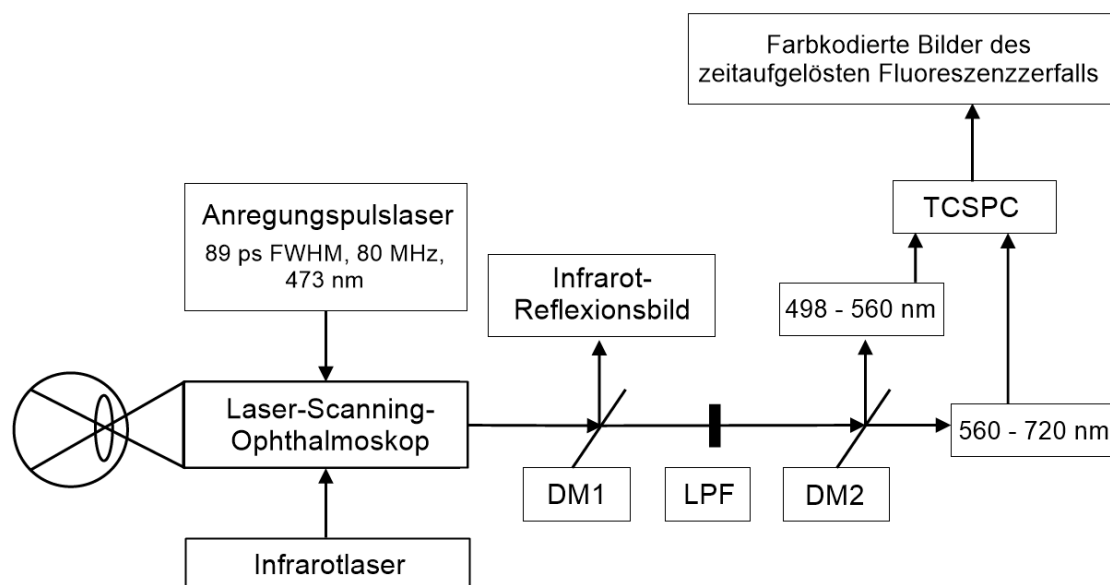


Abbildung 3: Technischer Aufbau des Fluoreszenzlebensdauerophthalmoskops (FLIO), angelehnt an Schweitzer 2010 (Schweitzer 2010)

Das FLIO-Gerät wurde von der Heidelberg Engineering GmbH (Heidelberg, Deutschland) entwickelt. Zur Messung der Fluoreszenzlebensdauern wird eine Laserdiode verwendet, welche die Fluorophore mit kurzen Laserpulsen einer Wellenlänge von 473 nm, einer Repetitionsrate von 80 MHz und einer Halbwertsbreite (*Full Width at Half Maximum* (FWHM)) von 89 ps anregt (Sauer et al. 2017a). Das FLIO-Gerät besitzt eine Zeitauflösung von ungefähr 30 ps, die auf einer *Instrument Response Function* von 172 ps im kurzwelligen Kanal 1 und 153 ps im langwelligen Kanal 2 basiert. Ein einzelner Laserimpuls setzt die Retina einer Energie von $2,5 \times 10^{-12}$ J aus. Dieses Energieniveau liegt mit einem Faktor von 10^4 deutlich unter dem maximal zugelassenen Energieniveau des American National Standards Institute (ANSI Z136.1-2000). Die Lebensdauer- und Intensitätsbilder der Fundusautofluoreszenz werden hier bei einer Rate von 9 Hz innerhalb eines $30^\circ \times 30^\circ$ Feldes erhoben, in dessen Zentrum die Makula liegt (Sauer et al. 2017a). Dies entspricht in etwa einer Größe von $9 \times 9 \text{ mm}^2$. Reflektiertes Anregungslicht wird durch einen Langpassfilter (LPF) vor den Detektoren geblockt. Die emittierten Photonen werden durch einen dichroitischen Spiegel (in Abbildung 3 als DM bezeichnet) in zwei getrennte Spektralkanäle geteilt (Kanal 1: 498 - 560 nm, Kanal 2: 560 - 720 nm) und jeweils durch einen Photomultiplier (HPM-100-40; Becker&Hickl GmbH, Berlin, Deutschland) detektiert. Erfasste Photonen im kurzwelligen Kanal werden der Fluoreszenz von NADH, AGE, FAD und Kollagen beziehungsweise Elastin zugeschrieben. Die Fluoreszenz im langwelligen Kanal wird durch Lipofuszin dominiert (Schweitzer 2010). Zur Lebensdauerermessung wird die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC: *time-correlated single photon counting*) verwendet (Klemm et al. 2015). Das Intervall zwischen zwei Laserimpulsen (12,5 ns) wird in 1024 Zeitkanäle aufgeteilt und die am Detektor eintreffenden Photonen werden entsprechend der Zeitverzögerung zum Anregungsimpuls in einen Zeitkanal eingezählt. Hieraus resultiert ein Histogramm, wie in Abbildung 4 gezeigt, das den exponentiellen Fluoreszenzzerfall widerspiegelt (Klemm et al. 2013).

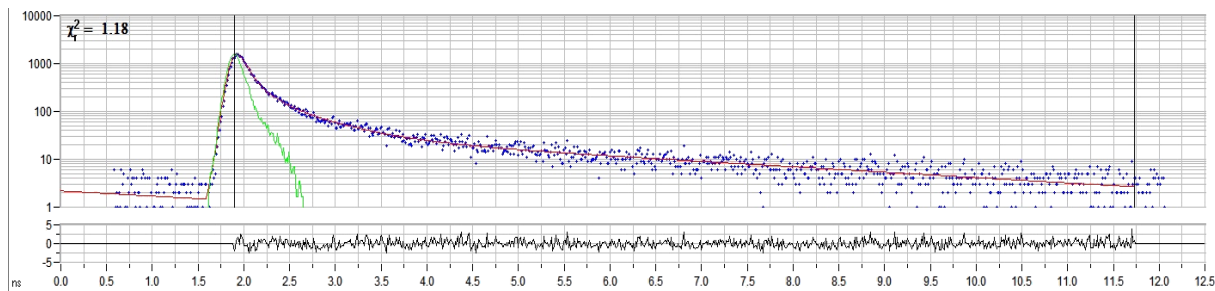


Abbildung 4: Darstellung eines Photonenhistogramms des exponentiellen Fluoreszenzzerfalls (blaue Punkte) am Beispiel der Makula. Rote Kurve: gefittete Kurve, Grün: *Instrument Response Function*

Jedes Photon wird hierbei zeitlich, örtlich und anhand seiner Wellenlänge charakterisiert (Dysli et al. 2014). Die Integration des TCSPC in ein Scanning Laser Ophthalmoskop liefert Bilder der Fluoreszenzlebensdauern mit einer Größe von 256 x 256 Pixeln. Um zu gewährleisten, dass jedes Photon an seiner richtigen Lokalisation registriert wird, werden gleichzeitig mit den Fluoreszenzbildern Infrarot-Reflexionsbilder aufgenommen, womit Augenbewegungen ausfindig gemacht werden und eine Lagekorrektur anhand eines Abbildes des Augenfundus durchgeführt werden kann (Schweitzer et al. 2007). Für ein ausreichendes Signal sollten pro Pixel mindestens 1000 Photonen aufgezeichnet werden. Um ein Bild zu erhalten, ist ein Scanning Laser Ophthalmoskop in das Gerät integriert.

1.2.2 Anwendungsbereiche der FLIO

Intensive Forschungsbemühungen haben den zukünftigen Einsatz der FLIO für eine frühzeitige Diagnosesicherung zum Ziel. Hierbei stehen funktionelle Veränderungen des Auges als Voraussetzung für eine effiziente Therapie im Frühstadium einer Erkrankung im Fokus. Durch die FLIO können jedoch auch grundlegende Veränderungen von Stoffwechselprozessen, die reversibel sind, entdeckt werden (Schweitzer et al. 2007).

Altersbedingte Makuladegeneration

FLIO konnte verlängerte Lebenszeiten der Autofluoreszenz bei Patienten mit einer Altersbedingten Makuladegeneration (AMD) im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen. Diese Änderung wird einer Modifikation der Konzentration von Fluorophoren des Lipofusins im RPE zugeschrieben. In Regionen mit geografischer Atrophie

finden sich verlängerte Werte für die Fluoreszenzlebensdauern. Diese sind vermutlich durch einen Verlust an RPE und Makulapigment bei Zunahme des Bindegewebes und damit einhergehender vermehrter Fluoreszenz von Kollagen und Elastin bedingt (Dysli et al. 2016a, Sauer et al. 2017b).

Morbus Stargardt

Bei der Stargardt-Krankheit handelt es sich um eine hereditäre Netzhautdystrophie. Eine Mutation im ABCA4-Gen führt zu einer starken Ansammlung von Produkten des visuellen Zyklus wie Lipofuszin. In Regionen mit diesen Ansammlungen finden sich hauptsächlich verlängerte Lebensdauern. Vereinzelt konnten zudem Stellen mit kürzeren Lebenszeiten festgestellt werden, die aber im Laufe der Zeit in Läsionen mit längeren Lebensdauern übergingen. Diese werden als frühe Anzeichen der Krankheit angesehen (Dysli et al. 2016b).

Retinaler Arterienverschluss

Bei arteriellen Gefäßverschlüssen der Retina konnten mittels FLIO verlängerte Lebensdauern in den ischämischen Bereichen während der akuten Phase aufgezeigt werden. Genaue Ursachen dieser Verlängerung konnten bisher nicht nachgewiesen werden und bedürfen weiterer Untersuchungen. In der postakuten Phase zeigt sich eine Regression der Lebensdauern in den Normalbereich trotz einer starken Verringerung der Dicke der Retina (Schweitzer et al. 2010, Dysli et al. 2015).

Makulaforamina

Durch Defekte der Retina im Bereich der Fovea kann es zu Makulaforamina kommen. Hier sind die Schichten der neuronalen Retina inklusive des Makulapigments unterbrochen und nur das RPE bleibt zurück. Lebensdauern in diesen Löchern sind signifikant länger als in unbeschädigten Regionen. In der direkten Nachbarschaft der Defekte finden sich oft ringförmig angeordnet die dislozierten retinalen Strukturen. Hier sind kurze Lebensdauern nachweisbar, was dem Makulapigment, welches dort zu finden ist, zugeschrieben wird. Diese Veränderungen finden sich allein im kurzwelligen Spektralkanal (Sauer et al. 2017a).

Morbus Alzheimer

Jentsch et al. konnten zeigen, dass durch die FLIO Veränderungen der Retina in Zusammenhang mit Alzheimer-spezifischen Markern aufgedeckt werden können. Dies wird den, durch Tau-Proteinen bedingten, Änderungen der neuronalen Retina zugeschrieben (Jentsch et al. 2015).

1.3 Diabetische Retinopathie

1.3.1 Ätiologie

Die diabetische Retinopathie ist eine schwerwiegende und häufige Komplikation des Diabetes mellitus und eine der führenden Ursachen für Erblindung in den Industrienationen (Tarr et al. 2013). Es lässt sich die nichtproliferative diabetische Retinopathie (NPDR) mit Mikroaneurysmen, harten Exsudaten, Hämorrhagien und venösen Anomalien von der weiter fortgeschrittenen proliferativen Retinopathie, gekennzeichnet durch Neovaskularisationen, präretinalen Blutungen in den Glaskörper und fibrovaskulären Proliferationen unterscheiden (Cai und McGinnis 2016). Die diabetische Retinopathie wird durch verstärkte Inflammation, Neurodegeneration und vaskuläre Schäden charakterisiert. Diese bilden häufig die ersten klinischen Anzeichen und gehen mit einer Hypoperfusion einzelner Regionen der Retina einher (Eisma et al. 2015). Durch die metabolische Fehlfunktion kommt es am Auge zu Veränderungen der retinalen Blutgefäße und dem Ausdünnen von Fundusstrukturen (Schweitzer et al. 2015). Viele verschiedene Stoffwechselwege beeinflussen die metabolische Dysfunktion, wie beispielsweise ein verstärkter Polyol-Stoffwechselweg, vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren, wie des *vascular endothelial growth factor* (VEGF), oder ein erhöhter Anfall von Glykosylierungsprodukten (AGEs) (Tarr et al. 2013). Die Entwicklung und der Verlauf der diabetischen Retinopathie verursachen meist keine Symptome, weswegen der Detektion früher Veränderungen eine besondere Bedeutung zukommt, um dem Visusverlust und einer möglichen finalen Erblindung durch therapeutische Maßnahmen vorbeugen zu können (Hammes et al. 2014). Um die Progredienz der Retinopathie zu verzögern, wird therapeutisch evidenzbasiert die Laserkoagulation angewendet, wodurch hypoxische Areale der Retina eliminiert und Neovaskularisationen verhindert werden.

1.3.2 Bildgebung bei diabetischer Retinopathie

Die Bildgebung spielt in der Diagnostik der diabetischen Retinopathie (DR) eine große Rolle - vorrangig um frühe Stadien erkennen zu können. Bei Verdacht auf DR oder zur Bestimmung des Schweregrads wird vom Augenarzt routinemäßig eine Refraktionsbestimmung, eine Spaltlampenuntersuchung der vorderen Augenabschnitte und eine binokulare mikroskopische Untersuchung des Augenhintergrundes bei dilatierter Pupille durchgeführt (Bundesärztekammer et al. 2015). Eine weitere Untersuchungsmethode bei DR ist die Fluoreszenzangiographie. Hierdurch lässt sich die Perfusion der Netzhaut beurteilen. Dazu wird Natrium-Fluoreszein intravenös appliziert und in bestimmten zeitlichen Abständen Fluoreszenzaufnahmen des Augenfundus gemacht. Somit erhält man eine dynamische Darstellung der Füllungsphasen der retinalen Gefäße. Veränderungen stellen sich hypo- oder hyperfluoreszent dar (Dithmar und Holz 2008). Es können Mikroaneurysmen, die häufig bei der diabetischen Retinopathie vorkommen, Defekte des Pigmentepithels, Flüssigkeitsaustritte aus entzündeten Gefäßen oder Gefäßverschlüsse abgebildet werden. Seltener wird Indocyanin-Grün intravenös verabreicht. Hierdurch ist eine selektivere Darstellung von Gefäßveränderungen der Choroidea möglich (Grehn 2012).

Schon 1991 wurde die optische Kohärenztomographie (OCT) als nichtinvasive Bildgebung am Auge beschrieben (Huang et al. 1991). Die OCT nutzt Licht niedriger Kohärenzlänge und misst die Tiefe reflektierender Strukturen in der Netzhaut aus Interferenzen mit dem Licht eines Referenzstrahls. Hiermit ist es möglich, zweidimensionale Schnittbilder des untersuchten Gewebes mit einer axialen Auflösung von 10 µm und einer seitlichen Auflösung von 20 µm zu gewinnen. Die Eindringtiefe ist auf zwei bis drei Millimeter beschränkt (Abtahian und Jang 2012). Da Hornhaut, Linse und Glaskörper nur in geringem Maße Licht absorbieren, ist eine Abbildung der Netzhaut möglich. Zur Bildgebung bei diabetischer Retinopathie wird das OCT vor allem bei Verdacht auf eine potentiell therapiebedürftige Makulopathie verwendet. Ein weiteres Anwendungsgebiet findet sich zur Indikationsstellung bzw. Verlaufskontrolle einer Therapie mit intravitrealen Medikamenten (Bundesärztekammer et al. 2015). Zudem ist eine quantitative Bestimmung der Netzhautdicke, ebenso wie die Darstellung diabetischer Veränderungen, beispielsweise Blutungen oder harter Exsudate, möglich.

1.3.3 Fluoreszenzlebensdauern bei diabetischer Retinopathie

Zur FAF bei diabetischer Retinopathie gibt es bisher nur wenige Daten. Bereits seit längerem ist die Erhöhung der kornealen Autofluoreszenz bekannt (Stolwijk et al. 1992). Es wurden zudem verlängerte Fluoreszenzlebensdauern bei Diabetikern beschrieben. Diese Verlängerung wurde besonders für τ_2 in Kanal 1 beim Vergleich zu gesunden Probanden auffällig. Interessant ist hierbei, dass diese Unterschiede zu einer gesunden Gruppe bereits sichtbar wurden, bevor Zeichen der diabetischen Retinopathie am Augenfundus zu erkennen waren (Schweitzer et al. 2011). Sind bereits diabetische Veränderungen zu erkennen, sind die Abklingzeiten in diesen Arealen besonders im kurzwelligen Kanal verlängert (Deutsch 2011). Häufig wurden diese Veränderungen durch eine Verschiebung von freiem zu protein-gebundenem NADH, vor allem in den metabolisch aktiven neuroretinalen Schichten wie den Photorezeptoren, erklärt (Schweitzer et al. 2011). Diese Erkenntnis ist jedoch aus heutiger Sicht fraglich. Zusätzlich konnten zuletzt einige FLIO-Parameter bestimmt werden, die sich bei Patienten mit NPDR signifikant von einer gesunden Kontrollgruppe unterscheiden (Sensitivität 90,09 %, Spezifität 71,40 %). Außerdem wurden signifikante Korrelationen der Amplituden α_1 und α_2 in Kanal 2 wie auch der Amplitude α_2 in Kanal 1 mit dem HbA_{1c} des Patienten gefunden (Schmidt et al. 2017). Häufig werden die Verlängerungen der Fluoreszenzlebensdauern den AGEs zugeschrieben (Schweitzer et al. 2011, Schmidt et al. 2017). Diese werden zudem als Biomarker für durch Diabetes mellitus verursachte Krankheiten verwendet.

Bei zusätzlicher Untersuchung der Augenlinse von Diabetikern zeigte sich eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauern. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Lebensdauer der Linse durch die Akkumulation von AGEs verringert wird. Im Gegensatz hierzu wird die kurze Lebenszeit von Lipofuszin, das am Fundus dominiert, durch die AGEs verlängert (Schmidt et al. 2017).

Diese Ergebnisse geben Anlass zur Vermutung, mittels FLIO durch die frühzeitige Detektion von Stoffwechselveränderungen bereits vor Auftreten morphologischer Schäden und einem Nachlassen der Sehkraft eine sichere Diagnose stellen zu können (Schweitzer et al. 2002).

2 Ziele der Arbeit

Klinisch etablierte Methoden zur Beurteilung des Augenfundus bilden vor allem morphologische Veränderungen ab, die bereits mit Beeinträchtigungen des Visus einhergehen können. Die FLIO ist eine neue Methode zur Identifizierung einzelner Fluorophore am Augenhintergrund mittels ihrer charakteristischen Abklingzeiten. Sie erlaubt dabei eine Beurteilung der Stoffwechselsituation am Augenhintergrund, wodurch eine frühzeitige Detektion von metabolischen Änderungen möglich sein kann. In früheren Studien wurde gezeigt, dass es möglich ist, durch die FLIO Veränderungen bei Erkrankungen am Augenfundus zu detektieren, teilweise bevor morphologische oder funktionelle Ausfälle sichtbar waren (Ramm et al. 2014, Schweitzer et al. 2015, Jentsch et al. 2015, Dysli et al. 2015, Dysli et al. 2016b, Schmidt et al. 2017). Ihre Anwendung ist bisher jedoch auf ein klinisch-experimentelles Setting beschränkt. Diese Arbeit soll durch Entwicklung eines vereinfachten Modells zur Auswertung des Zeitverhaltens der retinalen Autofluoreszenz einen Schritt in Richtung einer klinischen Anwendbarkeit der FLIO leisten. Bisher werden zur Interpretation der Ergebnisse sieben Parameter (T_m , T_{1-3} , α_{1-3}) verwendet, die jedoch in dem klinischen Alltag zu unübersichtlich sind. Daher wird zu der Beschreibung der Fluoreszenz in bisherigen klinischen Untersuchungen nur das amplitudengewichtete Mittel der einzelnen Fluoreszenzlebensdauern (T_m) analysiert (Dysli et al. 2014). Hierdurch gehen weitere, möglicherweise diagnostisch bedeutsame Informationen verloren. Ein zusätzliches Problem für die Bestimmung dieser sieben Parameter mit einer hinreichenden Genauigkeit ist die Notwendigkeit eines hohen Signal-Rausch-Verhältnisses der Messung. Um Dies zu erreichen, ohne die Untersuchungszeit für den Patienten (zwei - drei Minuten) zu erhöhen, werden bei der softwaregestützten Analyse jeweils 5 x 5 Pixel zusammengefasst. Dies führt jedoch zu einem Verlust von Ortsauflösung in dem Bild, wodurch kleine Strukturen unscharf abgebildet werden. Ziel dieser Arbeit ist, in einem vereinfachten Modell, die drei Zeitkonstanten altersentsprechend zu fixieren und alleinig deren relative Anteile an der Gesamtfluoreszenz zu bestimmen. Hierdurch würde die Zahl der zu bestimmenden Parameter verringert werden, wodurch die Ortsauflösung verbessert werden könnte. Weiterhin sollte die Parameterreduktion zu einem übersichtlicheren Bild von statistisch unabhängigeren Parametern führen.

Zudem soll das vereinfachte Modell durch den Vergleich mit bisherigen Ergebnissen, bei Verwendung des etablierten Modells zur Auswertung der Fluoreszenzabfälle über der Zeit bei einer gesunden Kontrollgruppe ($n = 92$) und einer Gruppe von Patienten mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie ($n = 34$), evaluiert werden. Bei Approximation mit fixierten Zeitkonstanten soll die Anpassung der Messdaten gegenüber freien Zeitkonstanten zu nicht wesentlich verringerter Güte bei erhöhter Ortsauflösung führen. Das amplitudengewichtete Mittel τ_m soll auch im vereinfachten Modell weiterhin als Parameter zur ersten Analyse verwertbar bleiben. Durch eine logistische Regression soll gezeigt werden, dass das hier eingeführte vereinfachte Modell zu einer ähnlich guten Trennung von Patienten mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie und Kontrollen wie in den von Schmidt et al. publizierten Ergebnissen führen kann (Schmidt et al. 2017). Vorteile für das vereinfachte Modell für den klinischen Einsatz könnten demnach in einer Erhöhung der Bildauflösung, einer deutlichen Reduktion der notwendigen Rechenzeit zur Erstellung der Lebensdauerbilder und der Nutzbarmachung der relativen Anteile der einzelnen Fluorophore für die Diagnostik bestehen.

3 Methodik

3.1 FLIO-Aufnahmen an Patienten mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie und gesunden Kontrollen

Bei den für diese Promotionsarbeit verwendeten FLIO-Aufnahmen handelt es sich um in der Arbeitsgruppe aufgenommene Bilder. Es wurden Bilder einer Kontrollgruppe und einer Gruppe von Patienten mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie ausgewählt. Vor der Untersuchung wurden eine Anamnese, eine Augenuntersuchung durch den Augenarzt und ein Aufklärungsgespräch durchgeführt. Die Aufnahmen am Fluoreszenzlebensdauerophthalmoskop erfolgten in einem abgedunkelten Raum an Augen mit, durch Tropicamid (Mydriatikum Stulln®, Pharma Stulln GmbH, Stulln, Deutschland), erweiterten Pupillen. Die durchschnittliche Untersuchungszeit betrug zwei bis fünf Minuten. Diese Aufnahmen wurden in der vorliegenden Arbeit nach dem bisherig in der Arbeitsgruppe etablierten und einem neuen Fitverfahren ausgewertet.

3.1.1 Testgruppen

Die Kontrollgruppe besteht aus 92 Personen zwischen 19 und 81 Jahren mit einem Altersmittelwert von 46,04 Jahren ohne klinisch relevante Augenerkrankungen. Somit konnte diese Kohorte als gesunde Referenzgruppe in den Untersuchungen angesehen werden.

Die Patientengruppe wird aus 34 Aufnahmen gebildet. Bei allen eingeschlossenen Patienten wurde eine nichtproliferative diabetische Retinopathie diagnostiziert. Bei jeweils neun Patienten zeigte sich eine milde beziehungsweise mäßige Ausprägung und bei 16 eine schwere Form. Das Alter der Patienten rangiert zwischen 46 und 79 Jahren um einen Mittelwert von 63,68 Jahren. Da bekannt ist, dass sich Unterschiede bei der Messung der zeitaufgelösten Autofluoreszenz zwischen Probanden mit natürlicher Linse und Intraokularlinse (IOL) primär bei längeren Abklingzeiten zeigen (Schweitzer et al. 2005), wurden in dieser Studie nur phake Probanden eingeschlossen. So kann der Linseneinfluss auf die Fluoreszenzkinetik minimiert werden.

Für statistische Vergleiche zwischen Kontroll- und Patientengruppe wurde die Kontrollgruppe, durch Ausschluss von Probanden mit einem Alter < 40 Jahre, altersgemäß der Patientengruppe angepasst. So entstand eine zweite Kontrollgruppe mit 48 Probanden zwischen 41 und 81 Jahren, deren Altersdurchschnitt bei 66,23 Jahren liegt. Für diese beiden Gruppen kann, nach dem Test von Kolmogorov-Smirnov mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors, von einer Normalverteilung ausgegangen werden (Kontrollgruppe: $p = 0,088$; Patientengruppe: $p = 0,200$). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde ein t-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt. Bei einer Signifikanz von $p = 0,19$ ist anzunehmen, dass statistisch kein Unterschied des Alters zwischen diesen beiden Gruppen besteht.

3.1.2 Triexponentielle Approximation des Fluoreszenzzerfalls

Die Gesamtfluoreszenz des Augenhintergrundes wird durch mehrere Fluorophore mit unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern bestimmt. Theoretisch ist der Zerfall eines Fluorophores monoexponentiell. Da jedoch in der Netzhaut, deren einzelne Schichten im FLIO nicht aufgelöst werden können, mehrere Fluorophore vorliegen, ergibt sich für die Gesamtfluoreszenz eine Summe von Exponentialfunktionen über die Zeit:

$$\frac{I(t)}{I_0} = IRF * \sum_i (\alpha_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}) \quad (4)$$

$I(t)$ – Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t , I_0 – Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0, IRF – *Instrument Response Function*, τ_i – Fluoreszenzlebensdauer der i -ten Komponente, α_i – ihr Anteil an der Gesamtfluoreszenz, * symbolisiert ein Faltungsintegral

Mittels der Software SPCImage der Becker und Hickl GmbH (Version 5.1, Berlin, Deutschland) ist eine Anpassung an die gemessenen Fluoreszenzabfälle durch Variation der Parameter τ_i und α_i in einem *least-square-fit* Verfahren durchführbar. Die Approximation der Fluoreszenz benötigt drei Exponentialfunktionen ($i = 1 \dots 3$). Daraus resultieren pro Bildpunkt und Spektralkanal sechs Parameter: τ_1 , τ_2 , τ_3 und α_1 , α_2 , α_3 . Zusätzlich werden Histogramme erstellt, welche die Häufigkeit eines Wertes im untersuchten Bild pro Parameter darstellen (Becker 2012b).

Um eine hinreichende Genauigkeit dieses Verfahrens zu erreichen, ist ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis nötig. Je größer die Zahl der Exponenten gewählt wird, desto höher ist die Anzahl der notwendigen Photonen, um die statische Sicherheit zur genauen Bestimmung des exponentiellen Zerfalls zu gewährleisten (Dysli et al. 2017). Um dies bei Verwendung einer Triexponentialfunktion generieren zu können, wird ein Binning von zwei festgelegt. Mit dieser Einstellung werden jeweils 5 x 5 Pixel zusammengefasst, was die Photonenanzahl pro Pixel um den Faktor 25 erhöht.

Zur Einschätzung der Güte des Approximationsverfahrens wird das reduzierte Chi-Quadrat (X_R^2) herangezogen. Dieses wird nachfolgender Gleichung bestimmt:

$$X_R^2 = \frac{X^2}{n - p} = \frac{1}{n - p} * \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)} \quad (5)$$

$N(t_k)$ = gemessene Photonenanzahl im Kanal k, $N_c(t_k)$ = kalkulierte Photonenanzahl nach Überlagerung mit IRF im Kanal k, k = Zeitkanal, n = Anzahl der Zeitkanäle, p = Anzahl der freien Parameter der Modellfunktion

Während des *least-square-fit* Verfahrens werden die Werte der Amplitude und Lebensdauern solange variiert, bis ein Minimum für X_R^2 gefunden wird. $X_R^2 = 1$ spricht für Abweichungen zwischen dem kalkultierten Modell und der Messung, die sich lediglich durch Rauschen der Letzteren bedingen. Bei deutlich höheren Werten muss von einem Fitergebnis mit schlechter Qualität gesprochen werden (Schweitzer et al. 2004, Smith et al. 2017).

Um eine generelle Einschätzung des Fluoreszenzzerfalls treffen zu können, wird in klinischen Untersuchungen bisher meist das amplitudengewichtete Mittel τ_m der einzelnen Fluoreszenzlebensdauern verwendet:

$$\tau_m = \frac{\alpha_1 * \tau_1 + \alpha_2 * \tau_2 + \alpha_3 * \tau_3}{\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3} \quad (6)$$

Nach Analyse der FLIO-Aufnahmen durch das Programm SPCImage mit den oben genannten Einstellungen wurden die Ergebnisse in das Programm FLIM eXplorer (FLIMX; Technische Universität Ilmenau, Deutschland (Klemm et al. 2015)) importiert, um die Daten weiter bearbeiten zu können. Zur Betrachtung

standardisierter Regionen des Augenfundus wurde die ETDRS (*early treatment diabetic retinopathy study group*) -Grid verwendet. Mittels dieser werden in vorliegender Promotionsarbeit durch konzentrische Ringe, in deren Zentrum die Makula liegt, drei verschiedene Regionen unterschieden: die Zentralregion (*central*), die Region des inneren Rings (*inner ring*) und die Region des äußeren Rings (*outer ring*) (siehe Abbildung 5). Der Radius der Zentralregion beträgt 0,5 mm, der des inneren Rings 1,5 mm und der des äußeren Rings 3 mm (Klemm et al. 2015). Jede dieser Regionen kann separat ausgewertet werden. Für die Bilder eines Probanden wurden die gleichen Koordinaten bei beiden angewendeten Fitverfahren benutzt, was eine übereinstimmende Auswertung ermöglicht.

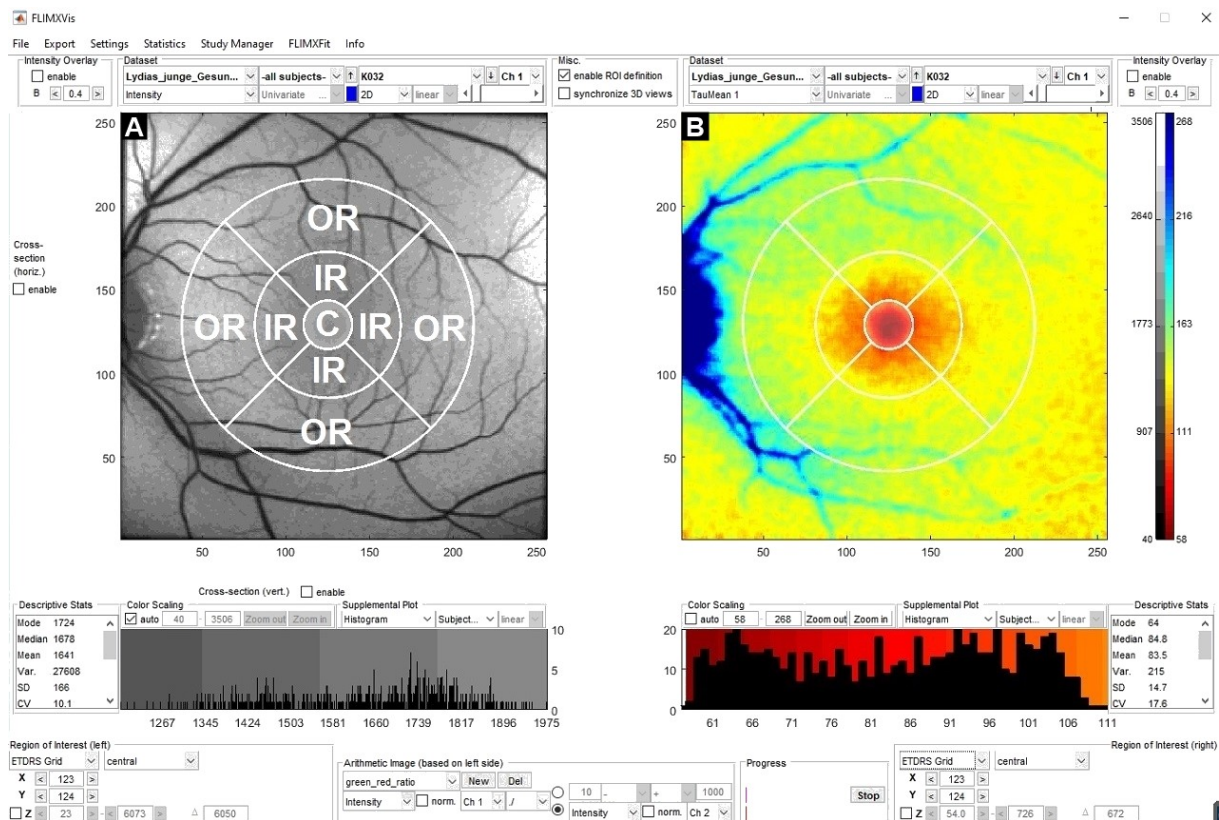


Abbildung 5: Ausgabefenster des Programmes FLIMX. Bild A: Intensitätsaufnahme mit angewendeter ETDRS-Grid in Kanal 1 (C: Zentralregion, IR: Region des inneren Rings, OR: Region des äußeren Rings), Bild B: mittlerer Fluoreszenzzerfall τ_m in Kanal 1 (498 - 560 nm)

3.2 Vereinfachtes Modell des Fluoreszenzzerfalls für die klinische Anwendung

3.2.1 Grundlagen des vereinfachten Modells

Bei dem vereinfachten Modell des Fluoreszenzzerfalls wird davon ausgegangen, dass die Fluoreszenz auf drei Fluorophore mit spezifischen Lebensdauern zurückzuführen ist und sich pathologische Veränderungen nur in deren relativen Anteilen an der Gesamtfluoreszenz niederschlagen. Es wurden die Zeitkonstanten des Fluoreszenzzerfalls beim Fitverfahren konstant gehalten und lediglich der relative Beitrag der einzelnen Exponentialkomponenten zur Gesamtfluoreszenz (α) bestimmt.

In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass sowohl die FAF als auch die Fluoreszenzlebensdauern signifikant mit dem Alter des Patienten korrelieren (Greenberg et al. 2013, Dysli et al. 2014). Anhand dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass eine Abweichung von Fluoreszenzlebensdauern von denen einer gesunden Person desselben Alters Hinweise auf eine mögliche Augenerkrankung geben könnte. Dies konnte für Patienten mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie durch Schmidt et al. bestätigt werden (siehe Gliederungspunkt 1.3.3) (Schmidt et al. 2017). Die Modellierung des Zeitverhaltens bei variablen Lebensdauern erfolgte durch eine Exponentialfunktion (siehe Gliederungspunkt 3.1.2). Werden die Fluoreszenzlebensdauern bereits vor Approximation festgelegt, wird die Exponentialfunktion in der Summengleichung zu einer Konstanten c , wodurch sich eine lineare Gleichung ergibt. Für $i = 3$ erhält man somit folgende Gleichung:

$$\frac{I(t)}{I_0} = \alpha_1 * c_1 + \alpha_2 * c_2 + \alpha_3 * c_3 \quad (7)$$

Bei der alleinigen Variation des Parameters α_i benötigt das Programm weniger Rechenzeit zur Approximation der Fluoreszenzzerfälle.

3.2.2 Berechnung von altersnormierten Fluoreszenzlebensdauern

Zur Auswertung der FLIO-Aufnahmen mittels eines vereinfachten Modells durch festgelegte Werte erfolgte die Verwendung altersnormierter Werte der Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{1...3}$. Diese wurden durch Gleichungen bestimmt, die es ermöglichen, für jeden Probanden anhand des Alters einen Wert für $\tau_{1...3}$ sowohl in Kanal 1 als auch Kanal 2 zu berechnen, der dem einer gesunden Person des gleichen Alters entsprechen soll. Die Gleichungen wurden anhand der Werte des triexponentiellen Approximationsverfahrens mit variablen Werten der Fluoreszenzlebensdauern, wie es in Gliederungspunkt 3.1.2 beschrieben wird, ermittelt. Die gesamte Kontrollgruppe der gesunden Probanden bildete hierbei die Referenzgruppe. Nach der Approximation wurde das Histogramm jeder Fluoreszenzlebensdauer ($\tau_{1...3}$) in beiden Kanälen separat in das Programm OriginPro 2016 (OriginLab, USA) exportiert, um den Mittelwert aus dem Histogramm zu berechnen. Anschließend wurden diese Mittelwerte mit dem Alter des jeweiligen Probanden korreliert. So entstand ein Punktdiagramm, durch welches mittels einer linearen Regression anschließend Gleichungen, welche die Zusammenhänge zwischen Alter und der ermittelten Lebensdauer τ_i der gesamten Kontrollgruppe wiedergeben, bestimmt wurden.

Nun konnte sowohl für die Kontrollgruppe als auch die Patientengruppe mit NPDR durch Einsetzen des Alters in die Gleichungen ein altersnormierter Wert für $\tau_{1...3}$ bestimmt werden. Diese errechneten Parameter wurden anschließend im Programm SPCImage vor einer erneuten Approximation als fixiert festgelegt und es wurde ohne Änderung weiterer Einstellungen ein wiederholtes Fitverfahren für jede FLIO-Aufnahme durchgeführt.

3.3 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Programm SPSS Version 24 (IBM Corporation, USA). Bei den statistischen Tests wurde von einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ ausgegangen. Bei einem Wert von $p \leq 0,05$ liegen signifikante Unterschiede vor.

3.3.1 Vergleich der mathematischen Modelle des Fluoreszenzzerfalls

Die Mediane der verschiedenen Parameter für die unterschiedlichen Flächen der ETDRS-Grid können durch das Programm FLIMX ausgegeben werden. Angaben zur deskriptiven Statistik erfolgten durch Median und Interquartilsabstand. Zuerst wurden innerhalb jeder Kohorte die Parameter auf Normalverteilung durch den Kolmogorov-Smirnov-Test mit Lilliefors-Korrektur getestet. Nachdem sich zeigte, dass nur wenige Parameter normalverteilt sind, wurden zur einheitlichen Darstellung im Folgenden ausschließlich nichtparametrische Tests verwendet. Der Vergleich der unterschiedlichen Testverfahren erfolgte somit innerhalb beider Probandengruppen durch den Wilcoxon-Test. Um Zusammenhänge zwischen einzelnen korrespondierenden Variablen darzustellen, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet. Weiterhin sollte die statistische Abhängigkeit der ermittelten Variablen innerhalb eines Spektralkanals zwischen den beiden Modellen verglichen werden. Als Maß der globalen Abhängigkeit aller Parameter untereinander wurde aus den Ergebnissen der gesamten Kontrollgruppe nach folgender Formel Cronbachs Alpha berechnet:

$$\alpha = \frac{N * \bar{r}}{1 + (N - 1) * \bar{r}} \quad (8)$$

N = Anzahl der Variablen, \bar{r} = Mittelwert der Absolutwerte der Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die paarweisen Korrelationen aller Parameter (Diekmann 1995)

Im Modell mit freien Parametern konnte damit der Zusammenhang von sechs Parametern im jeweiligen Spektralkanal betrachtet werden (T_1 , T_2 , T_3 , α_1 , α_2 , α_3). Bei fixierten Lebensdauern wurde die Beziehung von lediglich drei Parametern untereinander untersucht (α_1 , α_2 , α_3).

3.3.2 Vergleich von Kontroll- und Patientengruppe

Zum Vergleich der Approximationsverfahren zwischen Kontroll- und Patientengruppe wurden die Werte der altersangepassten Kontrollkohorte erneut mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Auch hier zeigten sich größtenteils nicht-normalverteilte Parameter. Somit erfolgte zum Vergleich der Gruppen die Durchführung des Mann-Whitney-U-Test. Zur Untersuchung der möglichen Trennung beider Gruppen wurde eine *Receiver Operating Characteristic* (ROC) - Analyse durchgeführt, womit sowohl die *Area under the curve* (AUC) als auch Werte für Sensitivität und Spezifität ermittelt werden konnten. Bei der Festlegung der Niveaus für Sensitivität und Spezifität wurde auf annähernd ähnliche Werte dieser beiden geachtet. Zuletzt wurde eine binär logistische Regression innerhalb der beiden Fitverfahren vorgenommen, um eine Variablenkombination ermitteln zu können, durch die eine möglichst effektive Trennung zwischen Patienten und gesunden Kontrollen möglich ist. Die Auswahl der Parameter erfolgte anhand nachfolgend beschriebener Kriterien, die das Problem der Multikollinearität vermindern, sodass nur hinreichend statistisch voneinander unabhängige Variablen verwendet wurden. Zum einen wurden ausschließlich Parameter betrachtet, die einzeln eine AUC über 0,5 aufweisen. Diese Variablen wurden in einem zweiten Schritt untereinander korreliert. Von Parametern, die einen Korrelationskoeffizienten nach Pearson von $> 0,8$ zeigten, wurde, um nicht zwei Werte einzuschließen, die dasselbe zu messen scheinen, derjenige mit der höheren AUC ausgewählt. So erhielt man mehrere Parameter, mittels derer die binär logistische Regression durchgeführt werden konnte. Hierbei erlangte man den positiv prädiktiven Wert, mit dem erneut eine ROC-Analyse durchgeführt wurde.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung des Zeitverhaltens der retinalen Autofluoreszenz ein vereinfachtes mathematisches Modell eingeführt. Hierbei wurden die Zeitkonstanten $\tau_{1...3}$ vor der Approximation fixiert. Die Ergebnisse dieses Modells wurden mit dem bisher verwendeten Modell der Arbeitsgruppe Experimentelle Ophthalmologie, bei dem die Lebensdauern mittels Modellierung des Fluoreszenzzerfalls durch eine Summe von drei Exponentialfunktionen unter Verwendung der Software SPCImage ermittelt werden, verglichen. Dies erfolgte in einer Kontrollgruppe und einer Patientengruppe mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie.

4.1 Ergebnisse zur Berechnung altersnormierter Fluoreszenzlebensdauern

Zunächst wurden die Fluoreszenzlebensdauern durch triexponentiellen Fit der Fluoreszenzabfälle im herkömmlichen Verfahren bestimmt. Hier konnte ein Zusammenhang der Lebensdauern τ_i mit dem Alter der Patienten festgestellt werden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem Alter und den Lebensdauern anhand des korrigierten Bestimmtheitsmaßes R^2 und zugehörigem p-Wert

	Zusammenhang des Alters mit					
	τ_1 Ch1	τ_2 Ch1	τ_3 Ch1	τ_1 Ch2	τ_2 Ch2	τ_3 Ch2
korr. R^2	0,755	0,435	0,420	0,683	0,781	0,485
p-Wert	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Zur Berechnung der altersnormierten Fluoreszenzlebensdauern wurde eine lineare Regression, die den Zusammenhang zwischen dem Alter des untersuchten Probanden und der Lebensdauer τ_i beschreibt, angewendet. Abbildung 6 zeigt beispielhaft die graphische Darstellung einer Solchen für die Fluoreszenzlebensdauer τ_1 . Die, durch die im Gliederungspunkt 3.2.2 beschriebene Methodik, erarbeiteten Gleichungen zeigt Tabelle 2. Anhand dieser Gleichungen konnten für jeden Probanden in beiden Spektralkanälen drei Fluoreszenzlebensdauern berechnet und vor dem Fitverfahren fixiert werden.

Tabelle 2: Gleichungen zur Berechnung altersnormierter Werte der Lebensdauern der Gesamtfluoreszenz (a = Alter der untersuchten Person)

	Kanal 1	Kanal 2
T1	$\tau_1 = 0,5548a + 61,559$	$\tau_1 = 0,7259a + 82,48$
T2	$\tau_2 = 1,6565a + 495,43$	$\tau_2 = 2,5189a + 471,08$
T3	$\tau_3 = 20,555a + 2672,9$	$\tau_3 = 12,157a + 2176,1$

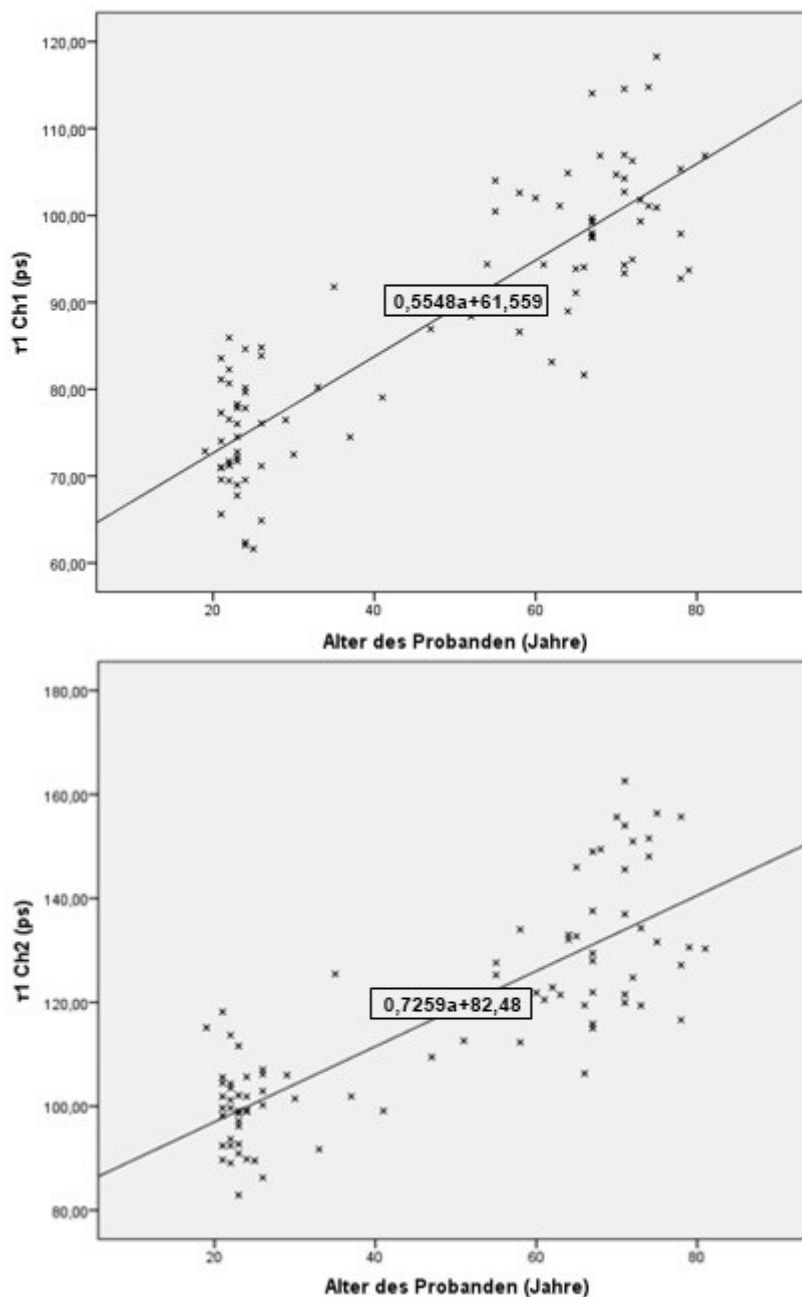


Abbildung 6: Lineare Regression zur Gleichungsbestimmung altersnormierter Werte der Fluoreszenzlebensdauern am Beispiel τ_1

4.2 Vergleich beider mathematischer Modelle zur Approximation des Fluoreszenzzerfalls

4.2.1 gesamte Kontrollgruppe

Zum Vergleich der beiden Approximationsmodelle wurde die gesamte Kontrollgruppe ($n = 92$) verwendet. Eine Auflistung über die Ergebnisse beider Approximationsverfahren, inklusive deren Vergleich, gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Darstellung der Mediane mit ihren Interquartilsabständen und der Korrelationen inklusive der p-Werte aller FLIO-Variablen zum Vergleich beider Approximationsverfahren innerhalb der gesamten Kontrollgruppe in der Zentralregion (c), im inneren Ring (ir) und äußeren Ring (or)

		Median \pm Interquartilbereich (T_m in ps, α in %)			Korrelation nach Pearson	p-Wert
		Variabel	Fixiert	p-Wert		
Ch1	T_m c	104,43 \pm 71,57	158,81 \pm 102,91	<0,005	0,936	<0,005
	T_m ir	163,85 \pm 93,15	186,55 \pm 93,88	<0,005	0,973	<0,005
	T_m or	289,51 \pm 87,14	191,06 \pm 86,68	0,049	0,982	<0,005
Ch2	T_m c	154,85 \pm 84,34	199,58 \pm 109,7	<0,005	0,952	<0,005
	T_m ir	196,53 \pm 87,87	215,7 \pm 95,24	<0,005	0,983	<0,005
	T_m or	221,86 \pm 88,33	225,57 \pm 88,4	0,302	0,979	<0,005
Ch1	α_1 c	94,55 \pm 4,23	94,88 \pm 3,77	<0,005	0,680	<0,005
	α_1 ir	90,68 \pm 5,55	90,2 \pm 4,37	<0,005	0,982	<0,005
	α_1 or	88,9 \pm 4,66	89,06 \pm 3,94	0,270	0,975	<0,005
Ch2	α_1 c	89,45 \pm 5,82	90,3 \pm 5,37	<0,005	0,985	<0,005
	α_1 ir	86,48 \pm 5,96	87,17 \pm 5,78	<0,005	0,987	<0,005
	α_1 or	88,9 \pm 4,66	85,35 \pm 4,86	0,082	0,977	<0,005
Ch1	α_2 c	4,45 \pm 3,36	3,22 \pm 2,16	<0,005	0,552	<0,005
	α_2 ir	7,62 \pm 4,45	7,13 \pm 3,65	0,510	0,942	<0,005
	α_2 or	9,17 \pm 4,14	8,81 \pm 3,29	<0,005	0,942	<0,005
Ch2	α_2 c	9,61 \pm 5,05	7,18 \pm 4,91	<0,005	0,916	<0,005
	α_2 ir	12,28 \pm 5,28	10,7 \pm 5,38	<0,005	0,963	<0,005
	α_2 or	13,41 \pm 4,23	12,96 \pm 4,16	0,668	0,952	<0,005
Ch1	α_3 c	0,81 \pm 0,74	1,38 \pm 1,78	<0,005	0,928	<0,005
	α_3 ir	1,52 \pm 0,82	1,85 \pm 1,20	<0,005	0,930	<0,005
	α_3 or	1,59 \pm 0,58	1,70 \pm 0,98	<0,005	0,942	<0,005
Ch2	α_3 c	0,93 \pm 0,77	1,42 \pm 1,37	<0,005	0,799	<0,005
	α_3 ir	1,20 \pm 0,70	1,46 \pm 1,08	<0,005	0,811	<0,005
	α_3 or	1,29 \pm 0,60	1,45 \pm 0,91	<0,005	0,827	<0,005
Ch1	X_R^2 c	1,08 \pm 0,06	1,65 \pm 0,47	<0,005	0,368	<0,005
	X_R^2 ir	1,08 \pm 0,04	1,19 \pm 0,12	<0,005	-0,012	0,905
	X_R^2 or	1,08 \pm 0,08	1,15 \pm 0,10	<0,005	-0,307	<0,005
Ch2	X_R^2 c	1,17 \pm 0,12	1,68 \pm 0,45	<0,005	0,388	<0,005
	X_R^2 ir	1,16 \pm 0,08	1,33 \pm 0,20	<0,005	0,284	0,006
	X_R^2 or	1,18 \pm 0,08	1,28 \pm 0,17	<0,005	0,316	<0,005

Bei Betrachtung des amplitudengewichteten Mittels des Fluoreszenzzerfalls τ_m fanden sich bei beiden Verfahren die kürzesten Zeiten im Makulabereich und eine Zunahme mit steigender Entfernung zur Zentralregion (siehe Abbildung 7). Wurden die Zeitkonstanten vor Approximation altersnormiert fixiert, wurden verlängerte Werte für τ_m gemessen. Obwohl die Mediane im Wilcoxon-Test signifikante Unterschiede zeigten, ließen sich anhand der Korrelationskoeffizienten nach Pearson hohe Zusammenhänge der korrespondierenden Werte erkennen. Abbildung 8 stellt die Verteilung der Mediane von τ_m innerhalb der verschiedenen Regionen der ETDRS-Grid dar.

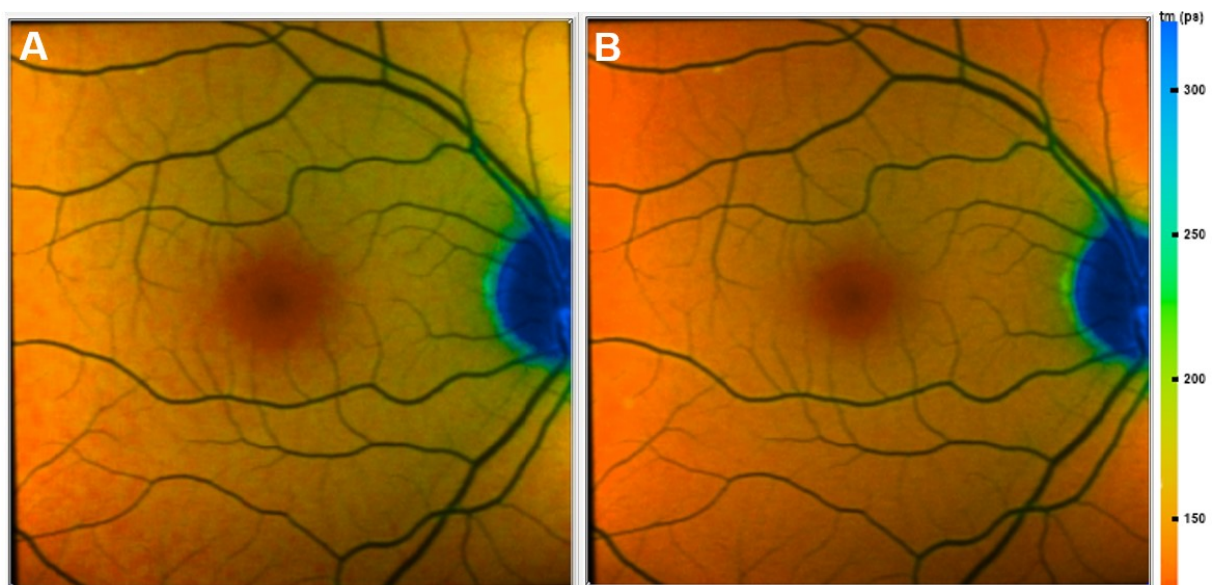


Abbildung 7: Mittel des amplitudengewichteten Fluoreszenzzerfalls τ_m nach Approximation mit variablen (Bild A) und fixierten (Bild B) Zeitkonstanten im kurzwelligen Spektralkanal (498-560 nm)

Im Vergleich der relativen Anteile an der Gesamtfluoreszenz zeigte der Wilcoxon-Test größtenteils signifikante Unterschiede zwischen den ermittelten Medianen aus den beiden Verfahren. Durch den Korrelationskoeffizienten nach Pearson wurden jedoch für alle Parameter in allen Regionen signifikante Zusammenhänge beschrieben. Generell fand sich in beiden Modellen eine ähnliche Verteilung der Amplituden. Den höchsten Beitrag leistete α_1 , den geringsten α_3 . Zu erkennen war zudem, dass die Interquartilbreite für α_3 bei altersnormiert fixierten Lebensdauern größer war als bei variablen Lebensdauern.

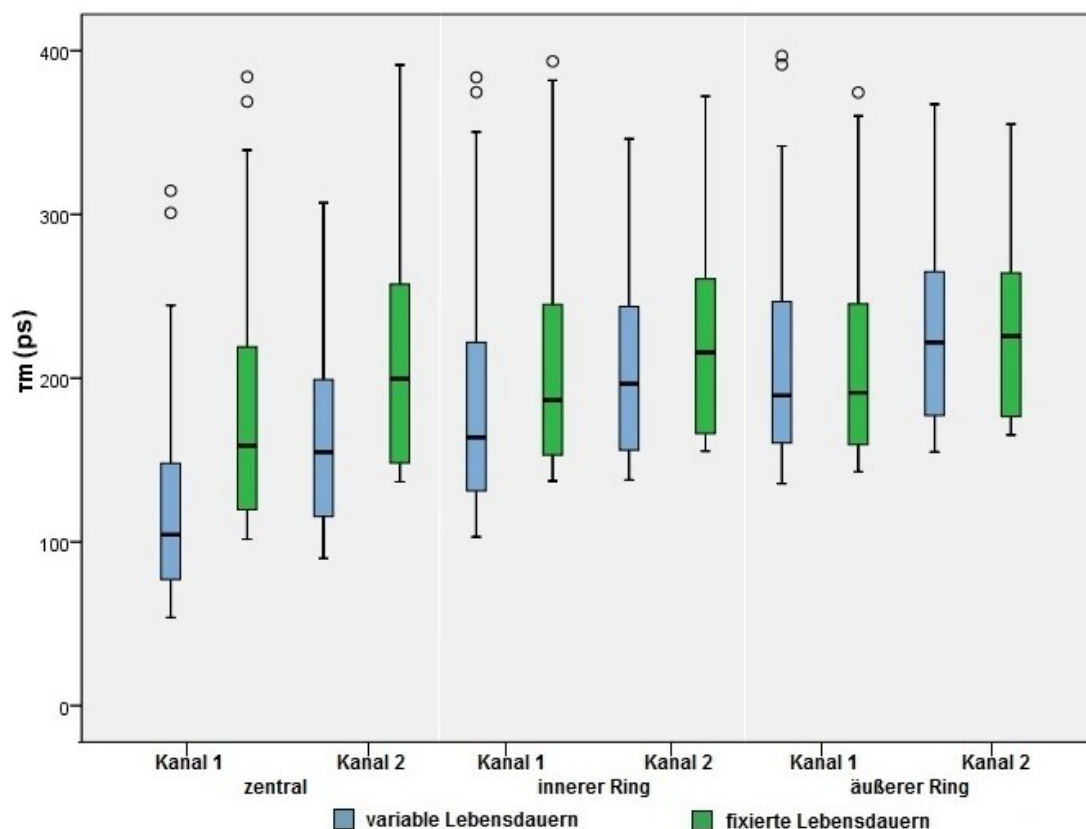


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Verteilung von τ_m in ps der Kontrollgruppe bei variablen (blau) im Vergleich mit fixierten Lebensdauern (grün)

In dieser Arbeit sollte zudem untersucht werden, ob mit Fixierung der Zeitkonstanten eine Verringerung der statistischen Abhängigkeit aller Variablen eines Spektralkanals untereinander erreicht werden kann. Hierzu wurde Cronbachs Alpha berechnet. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse für die drei untersuchten Regionen der ETDRS-Grid der zwei Spektralkanäle im Vergleich der beiden mathematischen Modelle zur Auswertung des Fluoreszenzverhaltens.

Tabelle 4: Cronbachs Alpha zur Beurteilung der Abhängigkeit der Variablen in beiden untersuchten mathematischen Modellen für drei Regionen der ETDRS-Grid

		Cronbachs Alpha	
		variable Lebensdauern	fixierte Lebensdauern
Ch1	zentral	0,844	0,899
	innerer Ring	0,926	0,774
	äußerer Ring	0,932	0,792
Ch2	zentral	0,933	0,773
	innerer Ring	0,947	0,904
	äußerer Ring	0,948	0,929

Mit Ausnahme der Zentralregion im kurzwelligen Spektralkanal zeigt sich ein kleinerer Wert des Cronbachs Alpha bei festgehaltenen Lebensdauern. In den Ringregionen des Kanals 1 und der Zentralregion des Kanals 2 wird dieser Unterschied am deutlichsten.

Um die Güte der Fits zu beurteilen, wurde das reduzierte Chi-Quadrat verwendet. Bei variablen Lebensdauern zeigten Werte nahe eins, dass Abweichungen des Modells von den Messdaten nur durch deren Rauschen bedingt sind. Bei Betrachtung der Auswertung mit altersentsprechend fixierten Lebensdauern lag der Median von χ_R^2 höher (siehe Abbildung 9). Am deutlichsten zeigte sich dies in der Zentralregion. Auffällig war zudem, dass der Interquartilbereich bei festgehaltenen Zeitkonstanten, am stärksten in der Zentralregion, erkennbar größer ist. Bei der Auswertung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson waren nur sehr niedrige, zum Teil negative, Korrelationen zu beobachten. Der Wilcoxon-Test bestätigte hierbei die Annahme, dass sich die Werte der beiden Fitverfahren signifikant voneinander unterscheiden.

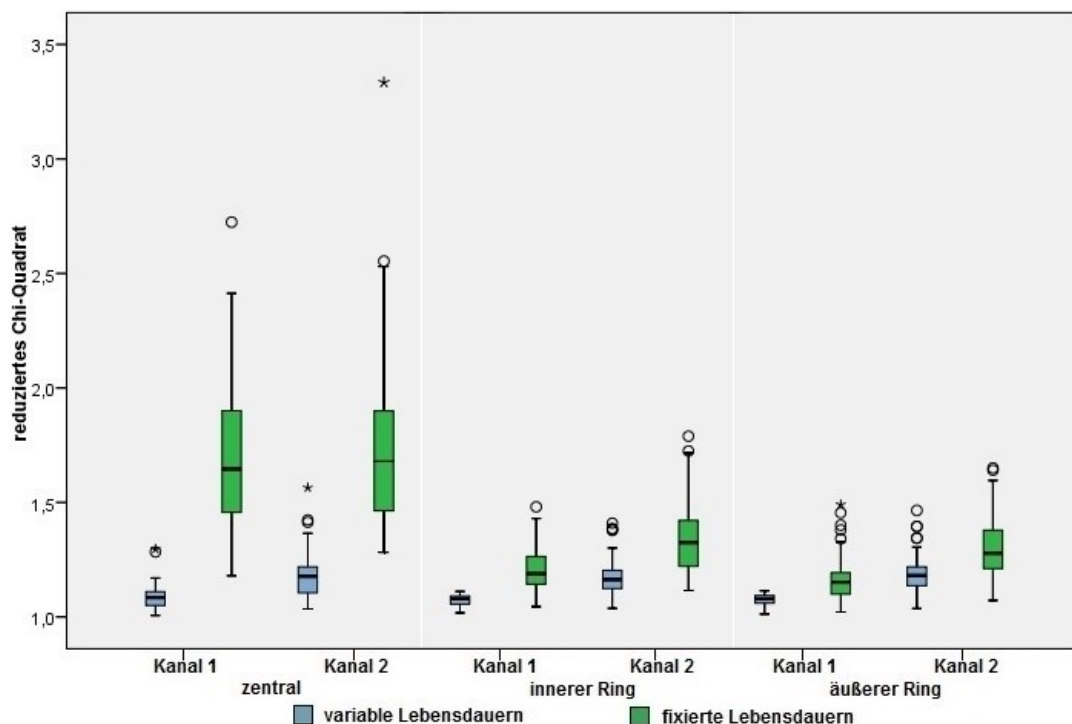


Abbildung 9: Vergleich der Verteilung von χ_R^2 nach Approximation mit variablen und mit fixierten Lebensdauern in der Kontrollgruppe

4.2.2 Patientengruppe

Eine genaue Auflistung der Ergebnisse nach Approximation mit beiden mathematischen Modellen innerhalb der Patientengruppe findet sich im Anhang unter dem Gliederungspunkt 8.1.1.

In beiden Verfahren wurden verlängerte mittlere Lebensdauern bei NPDR im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe gemessen. Es zeigten sich auch in der Patientengruppe hohe Korrelationskoeffizienten nach Pearson für den Parameter τ_m , wobei nach dem Wilcoxon-Test signifikante Unterschiede ihrer Mediane vorlagen, mit Ausnahme der Region des inneren Rings. Geringere Korrelationen als in der Kontrollgruppe fanden sich bei Betrachtung der Amplituden, jedoch lag auch hier in den meisten Fällen eine statistische Signifikanz vor. Der Wilcoxon-Test zeigte, außer für Amplitude 1 im langwelligen Spektralkanal, einen statistischen Unterschied der beiden Fitverfahren. Für die Amplitude 3 wurden bei festgehaltenen Zeitkonstanten, analog zu den Kontrollen (siehe Tabelle 3), höhere Werte gemessen als bei variablen Zeitkonstanten.

Auch innerhalb der Patientengruppe nahm das reduzierte Chi-Quadrat bei fixierten Lebensdauern höhere Werte als bei variablen Lebensdauern an.

4.3 Vergleich der mathematischen Modelle des Fluoreszenzzerfalls hinsichtlich der Trennung von Patienten und Kontrollen

Ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung der FLIO ist es, frühe Veränderungen bei Erkrankungen, die den Augenfundus betreffen, erkennen zu können. Dazu müssen aus der Vielzahl der erhaltenen Parameter jene bestimmt werden, durch welche die am besten zu erreichende Diskrimination möglich ist. Folgender Gliederungspunkt soll einen Überblick über diese mögliche Diskrimination durch die verschiedenen Variablen geben. Zum Vergleich der Kontrollgruppe und der Patientengruppe mit NPDR wird die altersgemäß angepasste Kontrollgruppe (n = 48) verwendet. In diese wurden alle Kontrollpersonen im Alter von über 40 Jahren eingeschlossen.

4.3.1 Vergleich beider Approximationsverfahren hinsichtlich einer möglichen Trennung von Kontroll- und Patientengruppe durch einzelne Parameter

Tabelle 5: Vergleich der gemessenen Mediane der FLIO-Parameter nach Approximation mit altersnormiert fixierten Zeitkonstanten zwischen beiden Testgruppen und Angabe des nach dem Mann-Whitney-U-Test erhaltenen p-Wertes

		Median \pm Interquartilbereich (T_m in ps, α in %)		
		Kontrollgruppe	Patientengruppe	p-Wert
Ch1	T_m C	158,81 \pm 102,91	307,95 \pm 141,54	<0,005
	T_m ir	186,55 \pm 93,88	321,85 \pm 136,1	<0,005
	T_m or	191,06 \pm 86,68	302,07 \pm 107,73	<0,005
Ch2	T_m C	199,58 \pm 109,7	279,3 \pm 93,7	0,026
	T_m ir	215,7 \pm 95,24	278,46 \pm 72,81	0,090
	T_m or	225,57 \pm 88,4	278,64 \pm 52,31	0,255
Ch1	α_1 C	94,88 \pm 3,77	84,49 \pm 5,49	<0,005
	α_1 ir	90,2 \pm 4,37	85,14 \pm 4,34	<0,005
	α_1 or	89,06 \pm 3,94	85,57 \pm 3,14	0,013
Ch2	α_1 C	90,3 \pm 5,37	84,14 \pm 3,26	<0,005
	α_1 ir	87,17 \pm 5,78	84,21 \pm 3,55	0,962
	α_1 or	85,35 \pm 4,86	84,04 \pm 3,33	0,120
Ch1	α_2 C	3,22 \pm 2,16	7,97 \pm 3,52	<0,005
	α_2 ir	7,13 \pm 3,65	8,33 \pm 2,89	0,135
	α_2 or	8,81 \pm 3,29	8,99 \pm 2,45	<0,005
Ch2	α_2 C	7,18 \pm 4,91	11,22 \pm 5,22	0,301
	α_2 ir	10,7 \pm 5,38	11,91 \pm 3,62	<0,005
	α_2 or	12,96 \pm 4,16	12,83 \pm 2,94	<0,005
Ch1	α_3 C	1,38 \pm 1,78	6,24 \pm 4,90	<0,005
	α_3 ir	1,85 \pm 1,20	5,86 \pm 3,67	<0,005
	α_3 or	1,70 \pm 0,98	5,59 \pm 3,24	<0,005
Ch2	α_3 C	1,42 \pm 1,37	4,26 \pm 2,28	<0,005
	α_3 ir	1,46 \pm 1,08	3,70 \pm 2,08	<0,005
	α_3 or	1,45 \pm 0,91	3,50 \pm 1,64	<0,005

Tabelle 5 zeigt die Mediane mit ihrer Interquartilbreite und die p-Werte nach dem Mann-Whitney-U-Test zwischen Kontroll- und Patientengruppe. Die mögliche Trennung einer Patientengruppe mit NPDR von einer gesunden Kontrollgruppe bei Approximation mit variablen Lebensdauern durch die verschiedenen FLIO-Parameter zeigt eine sich im Anhang befindende Tabelle unter dem Gliederungspunkt 8.1.2.

In bisherigen Untersuchungen, die sich mit der FLIO beschäftigten, wurde häufig das Mittel des amplitudengewichteten Fluoreszenzzerfalls τ_m zur Analyse der FAF herangezogen. Eine Darstellung der Vergleiche der Werte für Sensitivität und Spezifität gibt Abbildung 10 wieder. Diese wurden im Rahmen einer ROC-Analyse anhand der Variable τ_m sowohl bei Approximation mit variablen als auch fixierten Lebensdauern ermittelt. Auswertungen hinsichtlich dieses Parameters in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass sich das Mittel des amplitudengewichteten Fluoreszenzzerfalls bei der Approximation mit variablen Lebensdauern ausreichend zur Diskrimination der Gruppen eignet. Nach Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests wurde deutlich, dass sich die Werte für τ_m der Patienten signifikant von den Werten für τ_m der Kontrollen unterscheiden ($p < 0,05$) (siehe Tabelle 8 unter dem Gliederungspunkt 8.2.1). Anhand einer ROC-Analyse konnte in allen Fällen eine AUC von über 0,5 bestimmt werden. Eine etwas schlechtere Unterscheidung war bei festgehaltenen Fluoreszenzlebensdauern zu erkennen. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Patientengruppe waren laut Mann-Whitney-U-Test in der Zentralregion sowie im kurzwelligen Spektralkanal in den Ringregionen zu finden. Die AUC-Werte lagen durchgängig in Bereichen über 0,5.

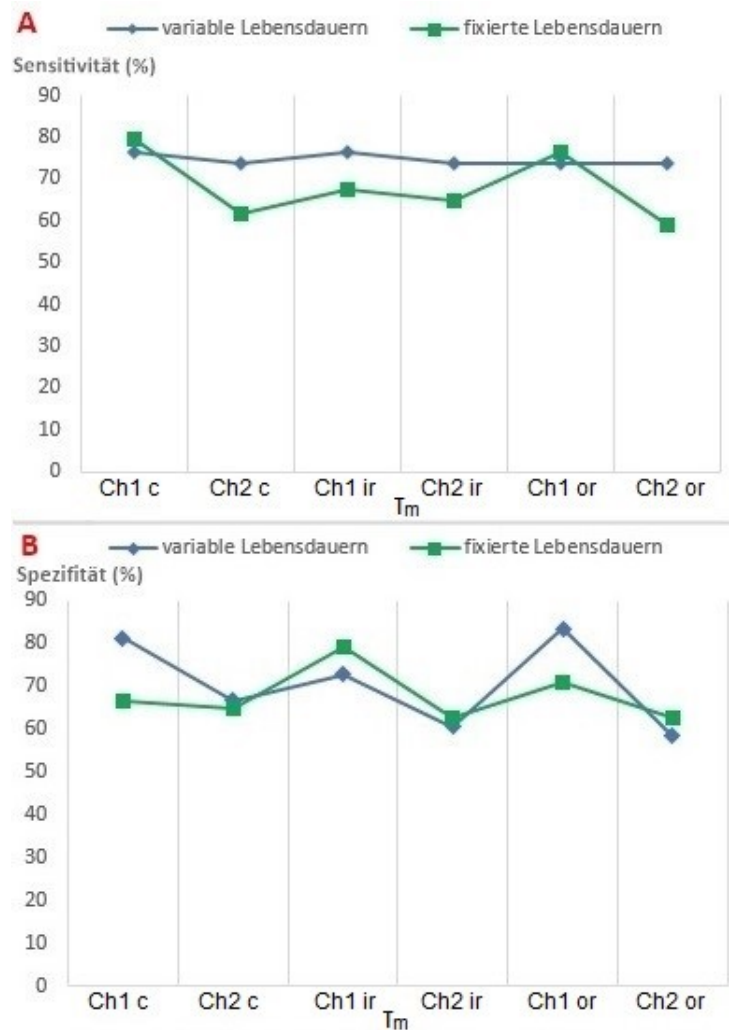


Abbildung 10: Darstellung der Sensitivität (Bild A, in %) und Spezifität (Bild B, in %) von τ_m bei variablen und fixierten Lebensdauern (c: Zentralregion, ir: innerer Ring, or: äußerer Ring)

Durch die Amplituden α_1 und α_2 war bei dem vereinfachten Auswertungsmodell eine Trennung von Patienten- und Kontrollgruppe schwer möglich. Der Mann-Whitney-U-Test zeigte für α_1 nur wenige Regionen, in denen ein signifikanter Unterschied zu finden war. Obwohl für α_2 in mehreren untersuchten Regionen eine statistische Signifikanz vorlag, waren die Werte der AUC ausschließlich im Bereich um und unter 0,5 für beide beschriebenen Modelle, wodurch die Trennung beider Gruppen erschwert war.

Bei Amplitude α_3 zeigte sowohl der Mann-Whitney-U-Test als auch die ROC-Analyse Unterschiede der Mediane zwischen beiden Gruppen auf. Eine Darstellung der Sensitivität und Spezifität liefert Abbildung 11.

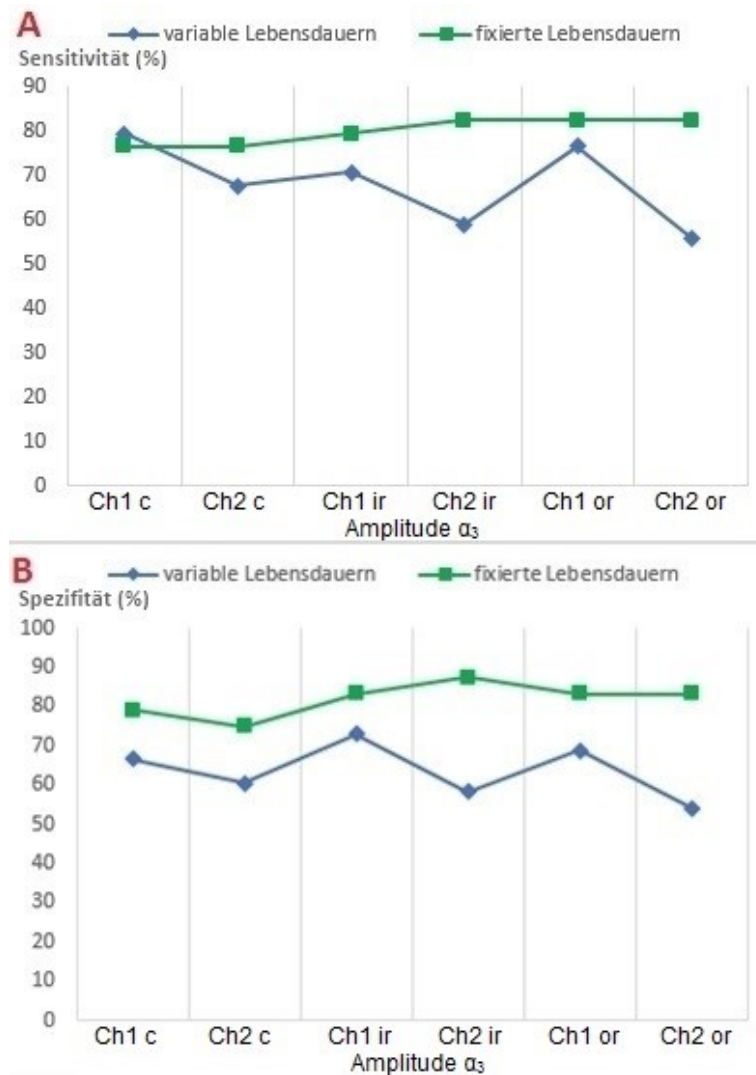


Abbildung 11: Darstellung der Sensitivität (Bild A, in %) und Spezifität (Bild B, in %) von α_3 bei variablen und fixierten Lebensdauern (c: Zentralregion, ir: innerer Ring, or: äußerer Ring)

Bei Approximation mit variablen Zeitkonstanten war in der Zentralregion in beiden Kanälen ein signifikanter Unterschied von α_3 zwischen Kontrollen und Patienten zu vermerken. In der Region des inneren und des äußeren Rings war dieser nur im kurzwelligen Kanal zu erkennen. Die AUC zeigte vor allem für Kanal 1 eine gut mögliche Trennung der beiden Gruppen an. Der Mann-Whitney-U-Test fand bei festgehaltenen Zeitkonstanten für alle Regionen der ETDRS-Grid signifikante Unterschiede der Werte für Amplitude 3 zwischen Kontroll- und Patientengruppe. Das Signifikanzniveau lag durchgängig bei $p < 0,005$. Auch in der ROC-Analyse konnten für die AUC hohe Werte für eine mögliche Trennung der Kohorten festgestellt werden. So lagen diese bei Werten $> 0,8$. Eine genaue Darstellung über die Werte der AUC für α_3 zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: AUC-Werte nach ROC-Analyse für Amplitude 3 bei Approximation mit variablen und altersnormierten festen Lebensdauern

		AUC	
		variable Lebensdauern	altersnormierte Lebensdauern
Ch1	α_3 central	0,822	0,870
	α_3 inner ring	0,812	0,875
	α_3 outer ring	0,813	0,903
Ch2	α_3 central	0,661	0,827
	α_3 inner ring	0,599	0,867
	α_3 outer ring	0,525	0,877

4.3.2 Trennung beider Gruppen durch eine logistische Regression

Um die bestmögliche Trennung von Kontroll- und Patientengruppe erreichen zu können, wurde nach einer Variablenkombination aus verschiedenen Werten der relativen Anteile an der Gesamtfluoreszenz gesucht, aus der größtmögliche Werte für Sensitivität und Spezifität resultieren. Hierzu wurde eine binär logistische Regression durchgeführt. Anhand des erhaltenen positiv prädiktiven Wertes konnte eine ROC-Analyse realisiert werden (genaue Beschreibung siehe Gliederungspunkt 3.3.2).

Für die logistische Regression bei Approximation mit variablen Lebensdauern wurden vier Parameter in die Analyse eingeschlossen. Hierbei handelte es sich um Amplitude α_1 des äußeren Rings in Kanal 2 (AUC = 0,556), Amplitude α_2 der Zentralregion in Kanal 1 (AUC = 0,670), Amplitude α_3 der Zentralregion in Kanal 1 (AUC = 0,822) sowie Kanal 2 (AUC = 0,661). Abbildung 12 zeigt das Ergebnis der ROC-Analyse mit dieser Variablenkombination. Es war möglich bei einer *Area under the curve* von 0,865 eine Sensitivität von 89,53 % und eine Spezifität von 73,53 % zu erreichen.

Zur logistischen Regression bei Approximation mit altersentsprechend fixierten Lebensdauern wurden andere Parameter berücksichtigt. Hier wurden die Amplitude α_1 des äußeren Rings in Kanal 2 (AUC = 0,601), Amplitude α_2 der Zentralregion in Kanal 1 (AUC = 0,792) und Amplitude α_3 des äußeren Rings in Kanal 1 (AUC = 0,903) verwendet. Nach ROC-Analyse, die in Abbildung 13 dargestellt ist, war eine Trennung von Kontrollen und Patienten mit dieser Parameterkombination mit einer Sensitivität von 91,18 % und einer Spezifität von 97,92 % möglich. Die AUC lag bei 0,98.

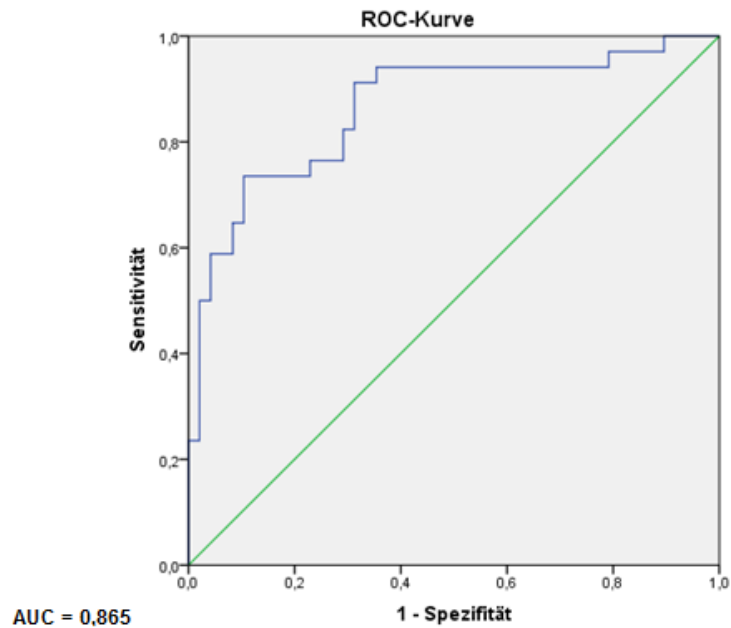


Abbildung 12: ROC-Analyse des positiv prädiktiven Wertes nach binär logistischer Regression statistisch unabhängiger Variablen der relativen Amplituden nach Approximation des Fluoreszenzzerfalls mit variablen Lebensdauern. Es resultiert eine mögliche Trennung der Patienten von gesunden Kontrollen mit einer Sensitivität von 89,53 % und einer Spezifität von 73,53 %

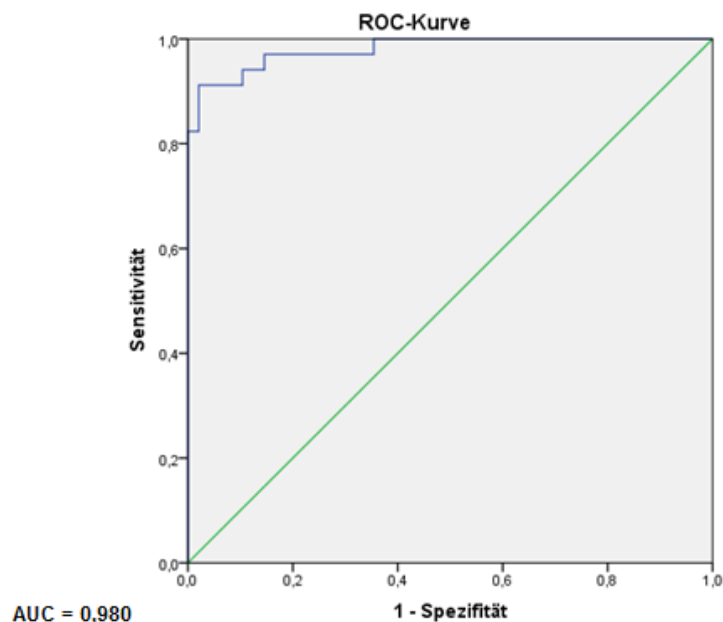


Abbildung 13: ROC-Analyse des positiv prädiktiven Wertes nach binär logistischer Regression statistisch unabhängiger Variablen der relativen Amplituden nach Approximation des Fluoreszenzzerfalls mit altersnormiert fixierten Lebensdauern. Nach diesem Modell ist eine Trennung von Patienten und gesunden Kontrollen mit einer Sensitivität von 91,18 % und einer Spezifität von 97,92 % möglich

5 Diskussion

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, auf Basis des bisherig verwendeten Datenmodells mit variablen Zeitkonstanten, ein neues vereinfachtes Modell zur Approximation des Fluoreszenzzerfalls am Augenfundus zu entwickeln. Bei der Auswertung der FLIO-Aufnahmen mit variablen Lebensdauern folgte der Fluoreszenzzerfall einem Muster, wie es bisher in Publikationen gezeigt wurde: kurze Lebenszeiten finden sich in der Makularegion, mittlere Lebenszeiten über die gesamte Netzhaut verteilt und die längsten Lebenszeiten auf der Papille (Schweitzer et al. 2007, Dysli et al. 2014). Zudem zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit der Zeitkonstanten mit dem Alter der Probanden. Bei Patienten mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie fanden sich die von Schmidt et al. beschriebenen verlängerten Lebensdauern (Schmidt et al. 2017). Die Ergebnisse der Approximation mit variablen Lebensdauern bestätigten somit Resultate bereits publizierter Untersuchungen und stellen eine geeignete Grundlage für die in dieser Promotionsarbeit erarbeiteten Gleichungen zur Berechnung altersnormierter, festgehaltener Fluoreszenzlebensdauern dar. Diese konnten als Basis für die Anwendung des vereinfachten Modells des Zeitverhaltens der retinalen Autofluoreszenz dienen.

Die Herangehensweise mit Fixierung der Zeitkonstanten verwendeten 2017 bereits Murashova et al., um die Funktion eines neuen Lasers zur Bildgebung an ungefärbten Retinae zu überprüfen. Hierbei setzten sie Lebenszeiten, die aus der Literatur bekannt waren, für Fluorophore wie Lipofuszin und A2E ein, um zu untersuchen, welchen Beitrag diese Fluorophore in bestimmten Schichten der Retina leisten. Sowohl bei bi- als auch triexponentieller Approximation konnte hier ein funktionierender Fit gewährleistet werden, bei dem mit dem neuen Laser Ergebnisse erzielt wurden, die mit aus Studien bekannten Ergebnissen übereinstimmen (Murashova et al. 2017).

Zur Untersuchung der FAF mit altersnormiert fixierten Lebensdauern und dem Augenmerk auf die Interpretation der relativen Beiträge der Exponentialkomponenten an der Gesamtfluoreszenz sind bisher keine Studien bekannt. Die vorliegende Dissertation soll erste Erkenntnisse hierzu liefern.

5.1 Erkenntnisse aus dem vereinfachten Modell des Fluoreszenzzerfalls

5.1.1 Vergleich mit bekannten Ergebnissen

Als wichtige Frage dieser Arbeit stellte sich, ob mit dem vereinfachten Modell des Fluoreszenzzerfalls aus Publikationen bekannte Ergebnisse zu erzielen sind. Dysli et al. veröffentlichten 2014 eine Studie, in der zunehmende mittlere FAF-Lebensdauern mit Entfernung zur Zentralregion in der ETDRS-Grid bei gesunden Probanden ermittelt wurden (Dysli et al. 2014). Auch bei festgehaltenen Zeitkonstanten konnte diese Zunahme in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Um das vereinfachte mathematische Modell nicht nur an einer gesunden Probandengruppe zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine Gruppe von Patienten mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie ausgewählt, an welcher das neue Modell ebenfalls getestet werden sollte. Die von Schmidt et al. beschriebenen verlängerten FAF-Lebenszeiten bei diesen Patienten, die sich besonders im kurzwelligen Spektralkanal zeigten, wurden ebenfalls bei hier eingeführtem Verfahren beobachtet (Schmidt et al. 2017).

Beim Vergleich der beiden Verfahren hinsichtlich der Mediane aller FLIO-Parameter zeigte der Wilcoxon-Test für den größten Teil aller Variablen signifikante Unterschiede. Für τ_m fanden sich trotz erhöhter absoluter Zahlenwerte hohe Korrelationskoeffizienten nach Pearson, womit davon ausgegangen werden konnte, dass auch bei Verwendung des vereinfachten Modells der Parameter τ_m für die Analyse der FLIO-Aufnahmen geeignet ist und die gleiche klinische Aussagekraft gewährleistet wird. Durch eine Änderung der Xanthophyllkonzentration und der Lipofuszinzusammensetzung verändern sich die Werte des α_1 und α_2 in den unterschiedlichen Regionen der ETDRS-Grid. Da die Xanthophyllkonzentration in der Peripherie abnimmt und sich in der Makularegion kaum der Bestandteil A2E des Lipofuszins findet, sinkt der Beitrag von α_1 mit zunehmender Entfernung zur Makula, während der Beitrag von α_2 steigt (Ablonczy et al. 2013, Sauer et al. 2015). Auch bei Approximation mit fixierten Zeitkonstanten waren diese Veränderungen messbar. Zudem konnten bei den relativen Beiträgen an der Gesamtfluoreszenz hohe Korrelationskoeffizienten zwischen beiden Verfahren gemessen werden.

Im bisherig verwendeten Modell zeigten sich hohe statistische Abhängigkeiten der Variablen innerhalb eines Spektralkanals bei Betrachtung der Regionen der ETDRS-Grid. Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob durch Fixierung der

Zeitkonstanten diese Abhängigkeit zu verringern ist. Mittels Cronbachs Alpha konnte eine marginale Reduktion der Abhängigkeit in einigen Regionen nachgewiesen werden. Diese befindet sich jedoch nicht in einem Größenbereich, in dem bereits von einer Unabhängigkeit der Parameter ausgegangen werden kann.

5.1.2 Möglichkeit der Trennung der Patientengruppe mit NPDR von einer gesunden Referenzgruppe

Das amplitudengewichtete Mittel des Fluoreszenzzerfalls τ_m ist ein geeigneter Parameter, um eine erste Übersicht über die Messung der FAF zu erhalten (Schweitzer 2010, Dysli et al. 2014). Bei Fixierung der Zeitkonstanten war eine Trennung von Patienten mit einer NPDR und gesunden Kontrollen durch diesen Parameter mit einer hohen statistischen Sicherheit ($p < 0,005$) in den drei untersuchten Regionen der ETDRS-Grid im kurzwelligen Spektralkanal möglich. Beim bisherig verwendeten Verfahren war diese in beiden Kanälen realisierbar. Jedoch fanden auch Schmidt et al. in ihrer Studie heraus, dass sich im kurzwelligen Spektralkanal deutlichere Unterschiede als im langwelligen Spektralkanal ermitteln ließen (Schmidt et al. 2017). Zudem hat sich bei wiederholten Messungen durch die FLIO im kurzwelligen Kanal eine höhere Reliabilität gezeigt (Klemm et al. 2013). Somit kann auch bei dem vereinfachten Modell davon ausgegangen werden, dass eine hinreichende Trennung beider Gruppen durch die Variable τ_m , vorrangig nun in Kanal 1, ermöglicht werden kann.

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte, dass bei Betrachtung der Amplituden $\alpha_{1...3}$ nach Auswertung mit fixierten Zeitkonstanten mehr statistische Unterschiede der Mediane vorlagen als im bisherigen Modell. Insbesondere im kurzwelligen Spektralkanal wurden diese erkennbar. Amplitude α_3 war der Parameter mit den größten Unterschieden bei geringen p-Werten. Bei variablen Lebenszeiten waren diese am deutlichsten in Kanal 1 zu erkennen, wurden die Zeitkonstanten festgehalten, war die Trennung jedoch in beiden Kanälen möglich ($p < 0,005$). Schmidt et al. zeigten, dass sich τ_3 gut zur Diskrimination von Patienten mit NPDR und gesunden Kontrollen eignet. Es wurde vermutet, dass diese mögliche Trennung durch eine erhöhte Konzentration von AGEs bei Patienten mit Diabetes mellitus bedingt ist (Schmidt et al. 2017). Von diesen ist bekannt, dass sie sich in verschiedenen Geweben des Auges ansammeln (Singh et al. 2001, Stitt 2005, Karumanchi et al. 2015). AGEs

führen am Augenfundus durch ihre Fluoreszenzeigenschaften zu verlängerten Fluoreszenzlebensdauern (Schweitzer et al. 2015, Schmidt et al. 2017). Die Glykosierungsendprodukte können durch die FLIO vor allem im kurzwelligen Spektralkanal durch τ_3 detektiert werden. Änderungen von τ_3 führen zu veränderten Werten ihres relativen Anteils an der Gesamtfluoreszenz α_3 . Dies könnte dazu beitragen, dass sich anhand dieses Parameters eine mögliche Trennung beider Testgruppen zeigt.

Nach Durchführung einer logistischen Regression konnten bei Approximation mit variablen Lebensdauern ähnliche Werte wie in der Publikation von Schmidt et al. erzielt werden (Schmidt et al. 2017). In genannter Publikation wurde bei einer AUC von 0,865 von einer möglichen Sensitivität von 90,09 % und einer Spezifität von 71,40 % gesprochen. In dieser Arbeit fanden sich mit einer Sensitivität von 89,53 % und einer Spezifität von 73,53 % nur geringe Abweichungen hiervon. Für die AUC konnte der gleiche Wert ermittelt werden. Im Gegensatz hierzu zeigten sich bei der Approximation mit fixierten Lebensdauern andere Ergebnisse der logistischen Regression. Die AUC konnte auf 0,980 erhöht werden und eine Trennung der beiden Gruppen war mit einer Sensitivität von 91,18 % und einer Spezifität von 97,92 % möglich. Obwohl mit drei Parametern weniger Variablen als bei der logistischen Regression mit freien Lebensdauern verwendet wurden, konnte die Trennschärfe verbessert werden, was für eine erhöhte Aussagekraft der einzelnen Variablen spricht. Den Schwerpunkt auf die relativen Beiträge der Komponenten an der Gesamtfluoreszenz zu legen, in dem die Lebensdauern fixiert werden und somit nicht in die Analyse der FLIO-Aufnahme einfließen, kann folglich als ein sinnvoller Schritt angesehen werden.

5.1.3 Einfluss auf die Ortsauflösung der FLIO-Aufnahmen

Um bei der TCSPC-Methode eine Analyse mit einer zufriedenstellenden Ortsauflösung garantieren zu können, ist eine ausreichende Anzahl an eingezählten Photonen nötig (Lee et al. 2001, Smith et al. 2017). Das Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*, SNR) wird durch folgende Formel definiert, wobei N die Anzahl der Photonen angibt:

$$SNR = \sqrt{N} \quad (9)$$

Eine niedrige Photonenzahl verursacht vermehrtes Rauschen, was die Ergebnisse der Approximation verschlechtern kann (Klemm 2017). Gleichzeitig wird durch einen Binningfaktor von zwei, der zu einer Zusammenfassung von 5 x 5 Pixeln führt, eine Beeinträchtigung der Ortsauflösung in Kauf genommen. Dieser wird bei triexponentieller Approximation verwendet, um eine ausreichende Photonenzahl erzielen zu können. Zudem wird vorausgesetzt, dass sich in den zusammengefassten Bereichen zueinander kongruente Fluorophore finden (Walsh et al. 2016). Generell kann jedoch angenommen werden, dass sich die Fluoreszenzlebensdauern benachbarter Pixel kaum verändern (Klemm 2017). Durch das Binning können kleinste Veränderungen, wie beispielsweise Drusen bei der AMD, unentdeckt bleiben. Werden die Zeitkonstanten vor der Approximation konstant gehalten, sollte es möglich sein, bei einer erhöhten Ortsauflösung auch bei einer geringeren Photonenzahl die Parameter $\alpha_{1...3}$ mit hinreichender Sicherheit zu bestimmen.

Walsh et al. untersuchten 2016 den Einfluss von fixierten Zeitkonstanten bei biexponentieller Approximation mit dem Programm SPCImage bei der Analyse eines simulierten Einkomponenten-Fluoreszenzzerfalls und der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Laktatdehydrogenase (NADH-LDH) in Lösung. Die Festlegung von τ_1 und τ_2 erfolgte für die untersuchten Fluorophore nach aus der Literatur bekannten Fluoreszenzlebenszeiten. Durch diese Einstellung konnte bei Betrachtung von α_1 die Irrtumswahrscheinlichkeit des ermittelten Wertes deutlich von 26,7 % auf 3,2 % gesenkt und auch bei geringer Photonenzahl ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden (Walsh et al. 2016). Diese Studie zeigte hierdurch, dass bei fixierten Zeitkonstanten keine Verfälschung der Ergebnisse stattfindet und eine Verbesserung der Ortsauflösung bzw. eine Aufnahme bei weniger eingezählten Photonen realisierbar gemacht werden konnte.

Bei Betrachtung der FLIO-Aufnahmen dieser Arbeit war nach Approximation mit fixierten Lebensdauern ein verringertes Rauschen zu erkennen. Dies führte zu einer besseren Ortsauflösung und kleine Strukturen wurden detaillierter dargestellt. Diese Verbesserungen zeigt beispielhaft Abbildung 14 für das amplitudengewichtete Mittel des Fluoreszenzzerfalls. An einigen Bildern wurde ein erneutes Fitverfahren mit altersnormiert fixierten Lebensdauern durchgeführt, hier jedoch mit einem Binningfaktor von eins. Mit dieser Einstellung erfolgte lediglich die Zusammenfassung

der direkt benachbarten Pixel, was die Anzahl der Photonen um den Faktor neun erhöhte. Bei triexponentieller Approximation mit variablen Lebensdauern und Binning von eins beträgt die Rechenzeit durch das Programm SPCImage mehrere Minuten. Zudem muss bedacht werden, dass eine höhere Photonenzahl notwendig ist, um eine hinreichende SNR erzielen zu können. Dies würde eine deutliche Verlängerung der Untersuchungszeit für den Patienten bedeuten. Um sowohl die Untersuchungs- als auch die Rechenzeit gering halten zu können, ist die Fixierung der Zeitkonstanten bei Verwendung eines Binningfaktors von eins eine mögliche Maßnahme.

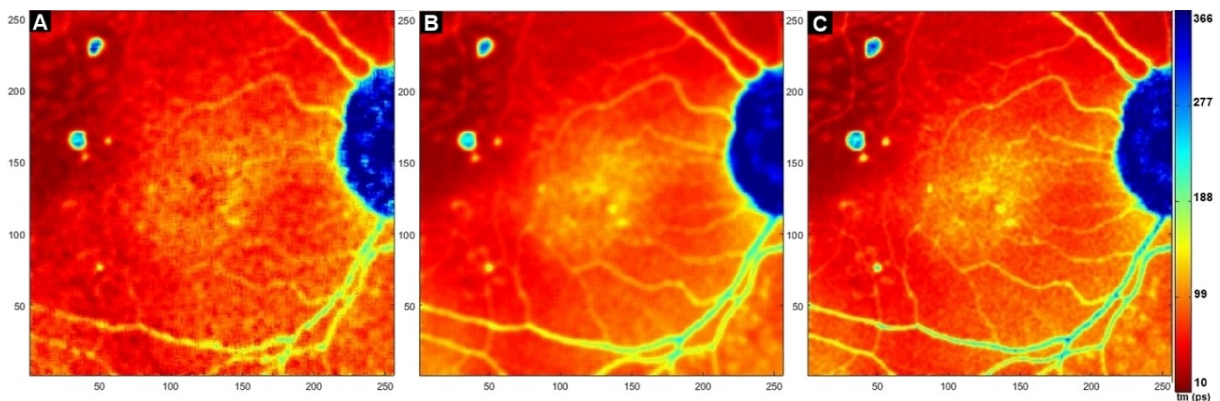


Abbildung 14: Darstellung des amplitudengewichteten Mittels τ_m in Kanal 1 (498-560 nm) zur Verdeutlichung der unterschiedlichen SNR: Bild A: variable Lebensdauern und Binning von zwei, Bild B: fixierte Lebensdauern und Binning von zwei, Bild C: fixierte Lebensdauern und Binning von eins

Auch über die relativen Anteile an der Gesamtfluoreszenz war durch festgehaltene Zeitkonstanten eine schärfere Darstellung, vor allem kleiner Strukturen, möglich. Als verwendbarer Parameter stellte sich α_2 in beiden Kanälen heraus. Ein Beispiel, zur Darstellung des verbesserten Signal-Rausch-Verhältnisses, gibt Abbildung 15, bei der die Amplitude α_2 im langwelligen Spektralkanal abgebildet ist. Strukturen am Augenfundus wie beispielsweise Gefäße, welche häufig Manifestationsort der NPDR sind (Cai und McGinnis 2016), konnten bei Approximation mit fixierten Lebensdauern deutlicher von dem umliegenden Gewebe abgegrenzt werden und kleine Auffälligkeiten waren nun darstellbar.

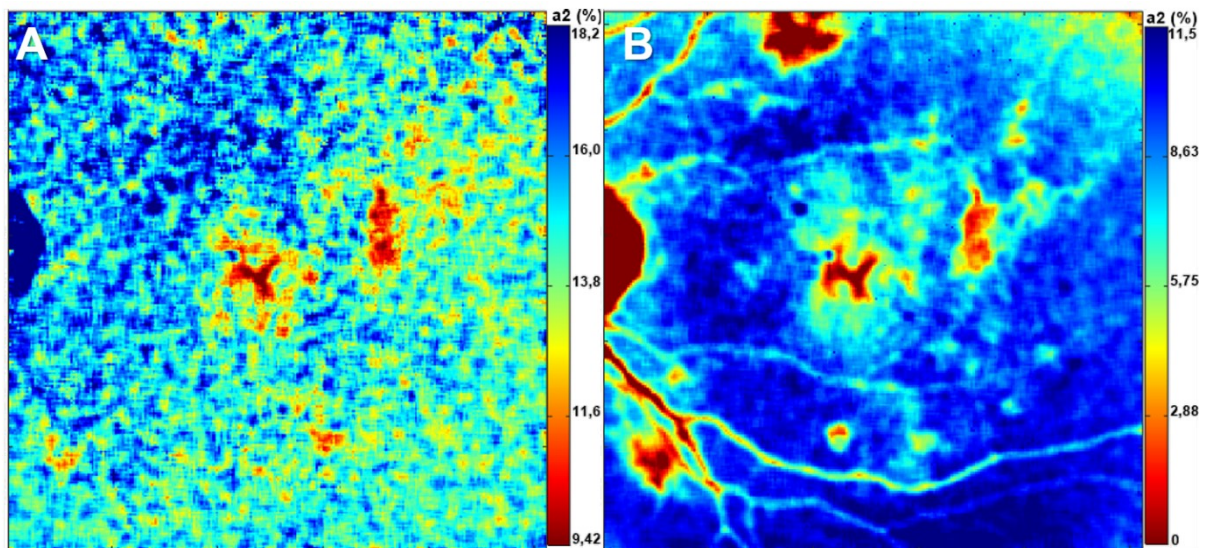


Abbildung 15: Darstellung des FLIO-Parameters α_2 im langwelligen Spektralkanal (560-720 nm) für beide mathematischen Auswertungsmodelle; Bild A zeigt variable Lebensdauern, Bild B fixierte Lebensdauern mit verbessertem SNR

5.2 Limitationen und Grenzen

5.2.1 Limitationen der Fluoreszenzlebensdauerophthalmoskopie

Die Fluoreszenz der Augenlinse hat einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss bei Messungen der Fluoreszenz am Augenfundus. Dieser Einfluss kann bis zu einem gewissen Grad durch das Konfokalprinzip supprimiert werden (Schweitzer et al. 2005, Klemm et al. 2016). Eine vollständige Ausschaltung dieser Wirkung kann jedoch aufgrund des großen Volumens und der starken Autofluoreszenz der Augenlinse nicht garantiert werden (Klemm 2017). Unterschiede der Linsentrübung, die auch bei jungen Probanden bereits auftreten können, beeinflussen durch eine Veränderung der SNR die FLIO-Messung und zeigen sich primär im kurzwelligen Spektralkanal (Schweitzer et al. 2007, Klemm et al. 2015). Die Fluoreszenzlebensdauern verlängern sich mit zunehmendem Alter, was auf eine Kataraktbildung und dem damit vergrößertem Linseneinfluss auf die FAF zurückzuführen sein könnte. Die häufigste Grunderkrankung, die zu Katarakt führt, ist der Diabetes mellitus (Grehn 2012). Nach Kataraktchirurgie mit Implantation einer IOL zeigen sich deutlich verkürzte mittlere Fluoreszenzlebenszeiten und eine Erhöhung an detektierten Photonen am Augenfundus (Klemm et al. 2016, Klemm 2017). Mit zunehmendem Alter steigt außerdem die Akkumulation von AGEs in der

Augenlinse, wodurch diese strukturell umgewandelt wird (Araki et al. 1992, Michael und Bron 2011). Es wird angenommen, dass bei Patienten mit Diabetes mellitus diese Ansammlung verfrüht einsetzt und hierdurch Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften der Linse hervorrufen kann (Hashim und Zarina 2011, Karumanchi et al. 2015). Diese Faktoren verursachen eine Beeinflussung der FLIO-Messung und müssen bei FLIO-Untersuchungen von Patienten mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie bedacht werden. Um den genauen Einfluss dieser Faktoren besser zu verstehen, bedarf es weiterführender Untersuchungen. Hierzu wäre es von wissenschaftlichem Interesse, eine Studie an Patienten mit NPDR und einer IOL durchzuführen, um den Einfluss der Linse zu eliminieren.

5.2.2 Grenzen des vereinfachten Datenmodells

In Tabelle 3 (Gliederungspunkt 4.2.1) zeigen sich bei den Parametern α_1 in beiden Kanälen und α_2 in Kanal 1 sehr ähnliche Medianwerte bei jedoch hochsignifikanten Unterschieden im Wilcoxon-Test. Dies kann durch eine signifikante Verschiebung der Verteilung der Werte im paarweisen Vergleich, beispielsweise durch einzelne Ausreißer, erklärt werden. Da der Wilcoxon-Test die Rangsummen des paarweisen Vergleiches betrachtet, konnte ein signifikanter Unterschied gefunden werden, obwohl sich bei Betrachtung der Mediane kein Unterschied feststellen ließ.

Eine mögliche Diskrimination beider Testgruppen war durch die Variable α_3 zu erreichen. Die AUC zeigte bei diesem Parameter eine ausreichende Trennung beider Gruppen. Bei einer Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der FAF-Messung wurde jedoch herausgefunden, dass diese Amplitude die geringste Verlässlichkeit bei triexponentieller Approximation zeigt. Hier wurden hohe Variationskoeffizienten beschrieben (Klemm et al. 2013). Um die genaue Aussagekraft dieses Parameters zu untersuchen, wären Follow-Up-Studien hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und der Bedeutung von α_3 zielführend. Als weiterer Punkt sollte genannt werden, dass Amplitude 3 durch viele verschiedene Fluorophore, vor allem durch das Bindegewebe des Auges und die Linse, bestimmt wird (Schweitzer et al. 2015, Sauer et al. 2015). Somit könnte vermutet werden, dass die unterschiedlichen Beiträge, die sich bei diabetischer Retinopathie zeigen, nicht durch Veränderungen des Augenfundus, sondern durch Veränderungen der Augenlinse bedingt sind. Dies erschwert die Interpretation von Veränderungen des Augenfundus. Es konnte bereits

gezeigt werden, dass die Mittelwerthistogramme für τ_3 von gesunden Probanden mit IOL und Patienten mit DR mit IOL sehr ähnlich sind (Deutsch 2011). Hier wurde jedoch keine Veränderung des Parameters α_3 untersucht, womit dies ein sinnvoller Schritt wäre, um den retinalen Einfluss auf diese Variable besser interpretieren zu können.

Bei der Betrachtung der Werte des reduzierten Chi-Quadrates wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Approximationsmodellen ermittelt. Nach Fixierung der Zeitkonstanten war sowohl innerhalb der Kontroll- als auch der Patientengruppe eine Zunahme der gemessenen Werte von X_R^2 zu erkennen. Die Festlegung eines Maximums, bei dem noch von einer akzeptablen Güte gesprochen werden kann, variiert bei verschiedenen Untersuchungsverfahren (Lakowicz 2006, Smith et al. 2017). Lakowicz schlägt vor, dass Veränderungen von X_R^2 erst ab Verdoppelungen des Wertes als signifikant angesehen werden, da kleine Veränderungen auf viele Faktoren und nicht alleinig auf das angewendete Modell zurückzuführen sein könnten (Lakowicz 2006). Innerhalb der Arbeitsgruppe Experimentelle Ophthalmologie hat sich bei Fitverfahren mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen durchgesetzt, die Approximation bei Werten von X_R^2 bis zu zwei als ausreichend zu bewerten. Hier muss von einem Einfluss eines systematischen Fehlers ausgegangen werden, da die Unterschiede zwischen dem Modell und der Messung nicht mehr allein durch das Rauschen, wie es bei einem Wert von eins der Fall ist, erklärt werden können. Da der systematische Fehler jedoch nicht alleinig für den Wert des X_R^2 verantwortlich ist, ist ein $X_R^2 < 2$ in der Analyse der FLIO-Aufnahmen vertretbar. Die Mediane lagen, wie in Tabelle 3 (Gliederungspunkt 4.2.1) und im Anhang (Gliederungspunkt 8.1.1) angegeben, bei dem vereinfachten Modell durchgehend bei Werten unter 1,9. Zusammenfassend ist erkennbar, dass die Fits mit altersnormiert festgehaltenen Zeitkonstanten die Messwerte schlechter, jedoch weiterhin ausreichend repräsentieren.

Da die festgelegten Zeitkonstanten aus den Ergebnissen der Approximation mit variablen Lebensdauern der gesamten FLIO-Aufnahme exklusive der Papillenregion bestimmt wurden, ist die Makularegion, durch ihre geringe Größe, verhältnismäßig gering repräsentiert. Dadurch wurden die berechneten Werte insbesondere für τ_1 , welches in der Makula das höchste Vorkommen aufweist, länger. Infolgedessen war die Approximation in dieser Region schlechter als in den übrigen Regionen. Dies wird

in Abbildung 16 ersichtlich. Unterhalb der Photonenstatistik ist die Kurve der gewichteten Residuen, welche die Abweichungen zwischen dem gemessenen Photonenhistogramm und der gefitteten Kurve darstellen, abgebildet (Becker 2012b). Für die Makularegion (Bild A) zeigten sich im Bereich der kürzesten Lebensdauern vermehrte Residuen (siehe Pfeil). Dies schlug sich auch in schlechteren Werten des reduzierten Chi-Quadrats nieder.

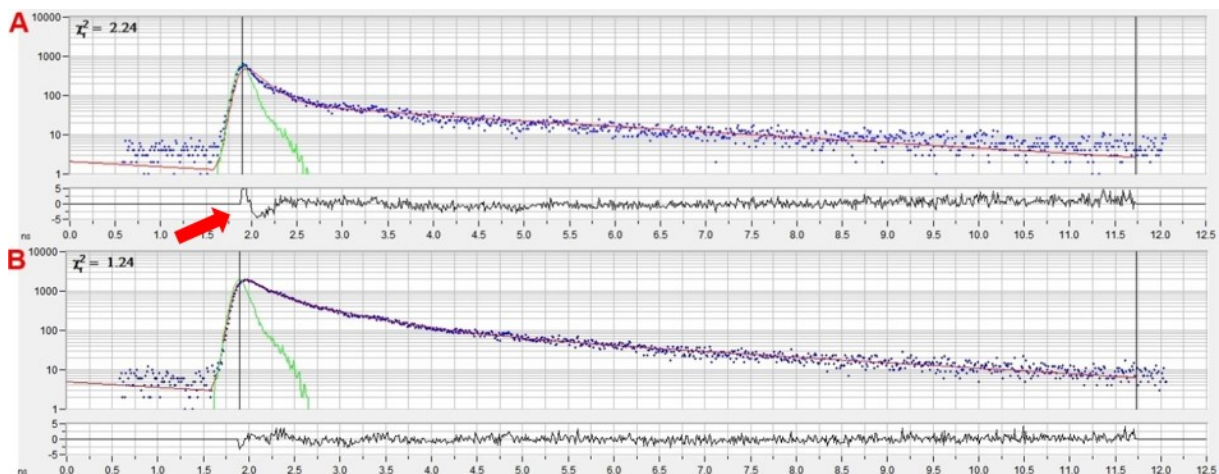


Abbildung 16: Photonenstatistik (blaue Punkte) und gefittete Kurve (rot) bei Approximation mit altersentsprechend fixierten Lebensdauern in unterschiedlichen Bereichen des Augenfundus; Bild A zeigt die Makularegion, Bild B den mittelperipheren Fundus; der rote Pfeil deutet auf ein Areal mit vermehrten Residuen des Fits im Bereich der kürzesten Lebensdauer τ_1

5.3 Ausblick

Bei der FLIO handelt es sich um eine neue Methode, durch die es möglich ist, Pathologien des Augenfundus durch Änderungen des Metabolismus bereits vor irreversiblen sichtbaren Veränderungen erkennen zu können. Dies könnte in Zukunft dazu führen, dem Patienten schon frühzeitig eine zielgerichtete Therapie zukommen zu lassen und somit die Progredienz der Erkrankung zu vermindern. Um die Fähigkeit der FLIO zur prognostischen Anwendung bei verschiedenen Krankheiten zu verbessern, ist es nötig Follow-Up Studien durchzuführen, durch die Veränderungen der FAF-Lebensdauern erfasst werden können. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits für Patienten mit nichtproliferativer diabetischer Retinopathie gezeigt werden, dass auch mit einer Vereinfachung des mathematischen Auswertungsmodells eine Trennung von gesunden Probanden und damit eine Detektion der Erkrankung möglich ist. Diese Untersuchung kann somit eine sinnvolle Ergänzung zu den bisherig etablierten Verfahren bei diabetischer Retinopathie darstellen.

Durch dieses vereinfachte Modell konnte eine geringe Reduktion der Abhängigkeit der Parameter voneinander erreicht werden. Eine weitere Verringerung wäre anzustreben, um die Aussagekraft der einzelnen Parameter erhöhen zu können. Da bisher wenige Erkenntnisse zur Aussagekraft der relativen Anteile an der Gesamtfluoreszenz bekannt sind, ist es nötig, weitere Untersuchungen hierzu durchzuführen. Einen möglichen Anknüpfungspunkt stellt die Studie von Klemm et al. dar. In dieser wurde die Wiederholbarkeit der FLIO-Messungen untersucht, wobei festgestellt wurde, dass der Parameter α_1 die größte Verlässlichkeit habe (Klemm et al. 2013). Dies könnte in einer weiteren Studie bei fixierten Zeitkonstanten genauer untersucht werden.

6 Schlussfolgerungen

Bisher ist die FLIO nur in klinisch-experimentellen Studien eingesetzt worden. Vielversprechende Ergebnisse, die sich auf früheste retinale Veränderungen konzentrieren, zeigen sich beispielsweise im Bereich der Diagnostik bei Diabetischer Retinopathie, Morbus Alzheimer oder Morbus Stargardt (Jentsch et al. 2015, Dysli et al. 2016b, Schmidt et al. 2017). Auch die Altersbedingte Makuladegeneration stellt ein interessantes Forschungsgebiet dar (Dysli et al. 2016a, Sauer et al. 2017b). Die Analyse der FAF-Abklingzeiten ist jedoch bisher sehr komplex und zeitaufwändig, was eine klinische Anwendbarkeit der FLIO erschwert. Da es sich bei dieser um eine ungefährliche reproduzierbare und nicht-invasive Methode zur Untersuchung der Retina handelt, wäre diese als routinemäßige Diagnostik jedoch von Vorteil, um zusätzliche Informationen gewinnen zu können (Klemm et al. 2013, Dysli et al. 2014, Sauer et al. 2015).

Das in dieser Doktorarbeit beschriebene neue, vereinfachte Modell könnte die Technik einer klinischen Anwendung deutlich näherbringen. Durch Wegfall der Analyse der FAF-Lebensdauern wäre die Zahl der zu interpretierenden Parameter durch einen klinisch tätigen Arzt reduziert. Trotzdem ergibt sich durch die Auswertung der relativen Anteile an der Gesamtfluoreszenz die Möglichkeit, einen tieferen Einblick in Veränderungen am Augenfundus durch Erkrankungen zu erhalten. Da durch Festhalten der Zeitkonstanten das Approximationsverfahren erheblich beschleunigt werden kann, ist eine Analyse mit weniger zeitlichem Aufwand verbunden. Zudem könnte bereits die FLIO-Aufnahme in einer reduzierten Zeit realisierbar sein, da durch Verringerung der freien Variablen ein Fitverfahren mit ausreichender Güte bei einer niedrigeren Photonenzahl durchzuführen ist. Dies konnte bereits in einer früheren Publikation bei simulierten Zerfallskurven bestätigt werden (Walsh et al. 2016). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein mathematisches Modell mit altersentsprechend fixierten Zeitkonstanten möglich ist und grundsätzlich konsistente Ergebnisse liefert. Das amplitudengewichtete Mittel τ_m , welches bisher für die Interpretation verwendet wurde, kann auch beim vereinfachten Modell weiterhin als erster Parameter zur Interpretation mit gleicher klinischer Aussagekraft wie bisher genutzt werden. Auch über die relativen Anteile an der Gesamtfluoreszenz ist es möglich relevante Veränderungen bei NPDR zu erkennen.

Bei Fixierung der Zeitkonstanten konnten mehr statistische Unterschiede der Mediane zwischen beiden Testgruppen gezeigt werden. Ebenso wurde eine geringe Reduktion der Abhängigkeit der Parameter voneinander nachgewiesen. Werden die Zeitkonstanten vor Approximation fixiert, ist eine verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Hierdurch sind durch eine optimierte Ortsauflösung kleine Strukturen genauer darstellbar. Dieses Ergebnis könnte vor allem bei Untersuchungen zur Altersbedingten Makuladegeneration von Bedeutung sein. Die logistische Regression zeigt durch Verwendung statistisch unabhängiger Variablen eine schärfere Trennung als sie bei Approximation mit variablen Lebensdauern möglich ist.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das hier eingeführte vereinfachte Modell in ersten Untersuchungen aussagekräftige Ergebnisse erbringen kann. Um die Veränderungen der Amplituden, sowohl für die generelle Interpretation als auch die Bedeutung bei retinalen Erkrankungen, und deren diagnostische Aussagekraft besser verstehen zu können, sind aufbauend auf dieser Arbeit weitere Studien notwendig.

7 Literaturverzeichnis

- Ablonczy Z, Higbee D, Anderson DM, Dahrouj M, Grey AC, Gutierrez D, Koutalos Y, Schey KL, Hanneken A, Crouch RK. 2013. Lack of correlation between the spatial distribution of A2E and lipofuscin fluorescence in the human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54 (8):5535-5542.
- Abtahian F, Jang IK. 2012. Optical coherence tomography: basics, current application and future potential. *Curr Opin Pharmacol*, 12 (5):583-591.
- Araki N, Ueno N, Chakrabarti B, Morino Y, Horiuchi S. 1992. Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *J Biol Chem*, 267 (15):10211-10214.
- Barker FM, 2nd, Snodderly DM, Johnson EJ, Schalch W, Koepcke W, Gerss J, Neuringer M. 2011. Nutritional manipulation of primate retinas, V: effects of lutein, zeaxanthin, and n-3 fatty acids on retinal sensitivity to blue-light-induced damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52 (7):3934-3942.
- Becker W. 2012a. Fluorescence lifetime imaging--techniques and applications. *J Microsc*, 247 (2):119-136.
- Becker W. 2012b. The bh TCSPC Handbook. 5th Edition Aufl.: Becker & Hickl GmbH.
- Becker W, Bergmann A, Hink MA, König K, Benndorf K, Biskup C. 2004. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microscopy Research and Technique*, 63 (1):58-66.
- Berezin MY, Achilefu S. 2010. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem Rev*, 110 (5):2641-2684.
- Boulton ME. 2014. Studying melanin and lipofuscin in RPE cell culture models. *Exp Eye Res*, 126:61-67.

- Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Prävention und Therapie von Netzhautkomplikationen bei Diabetes – Langfassung, 2. Auflage. Version 1. 2015.
- Cai X, McGinnis JF. 2016. Diabetic Retinopathy: Animal Models, Therapies, and Perspectives. *J Diabetes Res*, 2016:3789217.
- Chen M, Curtis TM, Stitt AW. 2013. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy. *Curr Med Chem*, 20 (26):3234-3240.
- Delori FC. 2004. Autofluorescence method to measure macular pigment optical densities fluorometry and autofluorescence imaging. *Arch Biochem Biophys*, 430 (2):156-162.
- Deutsch L. 2011. Evaluierung des Fluorescence Lifetime Imaging vom Augenhintergrund bei Patienten mit Diabetes mellitus [Dissertation] Jena, Germany: Friedrich-Schiller-Universität.
- Diekmann A. 1995. Empirische Sozialforschung. Grundlagen, Methoden, Anwendungen. 18. Aufl.
- Dithmar S, Holz FG. 2008. Fluoreszenzangiographie in der Augenheilkunde. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Dysli C, Wolf S, Zinkernagel MS. 2015. Fluorescence lifetime imaging in retinal artery occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56 (5):3329-3336.
- Dysli C, Wolf S, Zinkernagel MS. 2016a. Autofluorescence Lifetimes in Geographic Atrophy in Patients With Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57 (6):2479-2487.
- Dysli C, Wolf S, Hatz K, Zinkernagel MS. 2016b. Fluorescence Lifetime Imaging in Stargardt Disease: Potential Marker for Disease Progression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57 (3):832-841.

- Dysli C, Wolf S, Berezin MY, Sauer L, Hammer M, Zinkernagel MS. 2017. Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Prog Retin Eye Res*, 60:120-143.
- Dysli C, Quéllec G, Abegg M, Menke MN, Wolf-Schnurrbusch U, Kowal J, Blatz J, La Schiazza O, Leichtle AB, Wolf S, Zinkernagel MS. 2014. Quantitative analysis of fluorescence lifetime measurements of the macula using the fluorescence lifetime imaging ophthalmoscope in healthy subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55 (4):2106-2113.
- Eisma JH, Dulle JE, Fort PE. 2015. Current knowledge on diabetic retinopathy from human donor tissues. *World J Diabetes*, 6 (2):312-320.
- Eldred GE, Katz ML. 1988. Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization. *Exp Eye Res*, 47 (1):71-86.
- Feldman TB, Yakovleva MA, Arbukhanova PM, Borzenok SA, Kononikhin AS, Popov IA, Nikolaev EN, Ostrovsky MA. 2015. Changes in spectral properties and composition of lipofuscin fluorophores from human-retinal-pigment epithelium with age and pathology. *Anal Bioanal Chem*, 407 (4):1075-1088.
- Fujimori E. 1989. Cross-linking and fluorescence changes of collagen by glycation and oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 998 (2):105-110.
- Greenberg JP, Duncker T, Woods RL, Smith RT, Sparrow JR, Delori FC. 2013. Quantitative fundus autofluorescence in healthy eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54 (8):5684-5693.
- Grehn F. 2012. *Augenheilkunde*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Hammes HP, Lemmen KD, Bertram B, German Diabetes A. 2014. Diabetic retinopathy and maculopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 122 (7):387-390.
- Hashim Z, Zarina S. 2011. Advanced glycation end products in diabetic and non-diabetic human subjects suffering from cataract. *Age (Dordr)*, 33 (3):377-384.
- Herschel SJFW. 1845. On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless. *Philosophical Transactions*, 135:143-145.

- Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, et al. 1991. Optical coherence tomography. *Science*, 254 (5035):1178-1181.
- Ihanamaki T, Pelliniemi LJ, Vuorio E. 2004. Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye. *Prog Retin Eye Res*, 23 (4):403-434.
- Jentsch S, Schweitzer D, Schmidtke KU, Peters S, Dawczynski J, Bar KJ, Hammer M. 2015. Retinal fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy measures depend on the severity of Alzheimer's disease. *Acta Ophthalmol*, 93 (4):e241-247.
- Karumanchi DK, Gaillard ER, Dillon J. 2015. Early Diagnosis of Diabetes Through The Eye. *Photochem Photobiol*, 91:1497-1504.
- Klemm M. 2017. Theoretische und experimentelle Untersuchungen zur Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy [Dissertation] Ilmenau, Germany: Technische Universität.
- Klemm M, Dietzel A, Haueisen J, Nagel E, Hammer M, Schweitzer D. 2013. Repeatability of autofluorescence lifetime imaging at the human fundus in healthy volunteers. *Curr Eye Res*, 38 (7):793-801.
- Klemm M, Schweitzer D, Peters S, Sauer L, Hammer M, Haueisen J. 2015. FLIMX: A Software Package to Determine and Analyze the Fluorescence Lifetime in Time-Resolved Fluorescence Data from the Human Eye. *PLoS One*, 10 (7):e0131640.
- Klemm M, Blum J, Link D, Hammer M, Haueisen J, Schweitzer D. 2016. Combination of confocal principle and aperture stop separation improves suppression of crystalline lens fluorescence in an eye model. *Biomedical Optics Express*, 7 (9):3198-3210.
- Koenig K, Schneckenburger H. 1994. Laser-Induced Autofluorescence for Medical Diagnosis. *J Fluorescence*, 4 (1):17-40.

- Lakowicz JR. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. 3. Aufl. Boston, MA: Springer Science+Business Media, LLC.
- Lee KC, Siegel J, Webb SE, Leveque-Fort S, Cole MJ, Jones R, Dowling K, Lever MJ, French PM. 2001. Application of the stretched exponential function to fluorescence lifetime imaging. *Biophys J*, 81 (3):1265-1274.
- Marcu L. 2012. Fluorescence lifetime techniques in medical applications. *Ann Biomed Eng*, 40 (2):304-331.
- Michael R, Bron AJ. 2011. The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366 (1568):1278-1292.
- Murashova GA, Mancuso CA, Canfield JL, Sakami S, Palczewski K, Palczewska G, Dantus M. 2017. Multimodal nonlinear optical imaging of unstained retinas in the epi-direction with a sub-40 fs Yb-fiber laser. *Biomed Opt Express*, 8 (11):5228-5242.
- Ramm L, Jentsch S, Augsten R, Hammer M. 2014. Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy in glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*.
- Sauer L, Schweitzer D, Ramm L, Augsten R, Hammer M, Peters S. 2015. Impact of Macular Pigment on Fundus Autofluorescence Lifetimes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56 (8):4668-4679.
- Sauer L, Peters S, Schmidt J, Schweitzer D, Klemm M, Ramm L, Augsten R, Hammer M. 2017a. Monitoring macular pigment changes in macular holes using fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Acta Ophthalmol*, 95 (5):481-492.
- Sauer L, Klemm M, Peters S, Schweitzer D, Schmidt J, Kreilkamp L, Ramm L, Meller D, Hammer M. 2017b. Monitoring foveal sparing in geographic atrophy with fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy - a novel approach. *Acta Ophthalmol*.

- Schmidt J, Peters S, Sauer L, Schweitzer D, Klemm M, Augsten R, Muller N, Hammer M. 2017. Fundus autofluorescence lifetimes are increased in non-proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*, 95 (1):33-40.
- Schweitzer D. 2010. Metabolic Mapping. In: Holz F, Hrsg. *Medical Retina: Focus on Retinal Imaging*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 107-124.
- Schweitzer D, Hammer M, Schweitzer F. 2005. [Limits of the confocal laser-scanning technique in measurements of time-resolved autofluorescence of the ocular fundus]. *Biomed Tech (Berl)*, 50 (9):263-267.
- Schweitzer D, Kolb A, Hammer M, Anders R. 2002. Zeitaufgelöste Messung der Autofluoreszenz - ein Werkzeug zur Erfassung von Stoffwechselvorgängen am Augenhintergrund. *Der Ophthalmologe*, 99 (10):774-779.
- Schweitzer D, Quick S, Klemm M, Hammer M, Jentsch S, Dawczynski J. 2010. Time-resolved autofluorescence in retinal vascular occlusions. *Ophthalmologe*, 107 (12):1145-1152.
- Schweitzer D, Hammer M, Schweitzer F, Anders R, Doebbecke T, Schenke S, Gaillard ER, Gaillard ER. 2004. In vivo measurement of time-resolved autofluorescence at the human fundus. *J Biomed Opt*, 9 (6):1214-1222.
- Schweitzer D, Schenke S, Hammer M, Schweitzer F, Jentsch S, Birckner E, Becker W, Bergmann A. 2007. Towards metabolic mapping of the human retina. *Microsc Res Tech*, 70 (5):410-419.
- Schweitzer D, Klemm M, Quick S, Deutsch L, Jentsch S, Hammer M, Dawczynski J, Kloos CH, Mueller UA. 2011. Detection of early metabolic alterations in the ocular fundus of diabetic patients by time-resolved autofluorescence of endogenous fluorophores. *Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II*, 8087:80871G.
- Schweitzer D, Deutsch L, Klemm M, Jentsch S, Hammer M, Peters S, Haueisen J, Muller UA, Dawczynski J. 2015. Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy in type 2 diabetic patients who have no signs of diabetic retinopathy. *J Biomed Opt*, 20 (6):61106.

- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44 (2):129-146.
- Smith DA, McKenzie G, Jones AC, Smith TA. 2017. Analysis of time-correlated single photon counting data: a comparative evaluation of deterministic and probabilistic approaches. *Methods Appl Fluoresc*, 5 (4):042001.
- Smith RT, Bernstein PS, Curcio CA. 2013. Rethinking A2E. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54 (8):5543.
- Sparrow JR, Boulton M. 2005. RPE lipofuscin and its role in retinal-pathobiology. *Experimental Eye Research*, 80 (5):595-606.
- Stitt AW. 2005. The maillard reaction in eye diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 1043:582-597.
- Stolwijk TR, van Best JA, Oosterhuis JA, Swart W. 1992. Corneal autofluorescence: an indicator of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33 (1):92-97.
- Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. 2013. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol*, 2013:343560.
- Trieschmann M, van Kuijk FJ, Alexander R, Hermans P, Luthert P, Bird AC, Pauleikhoff D. 2008. Macular pigment in the human retina: histological evaluation of localization and distribution. *Eye (Lond)*, 22 (1):132-137.
- Walsh AJ, Sharick JT, Skala MC, Beier HT. 2016. Temporal binning of time-correlated single photon counting data improves exponential decay fits and imaging speed. *Biomed Opt Express*, 7 (4):1385-1399.
- Yakovleva MA, Feldman TB, Arbukhanova PM, Borzenok SA, Kuzmin VA, Ostrovsky MA. 2017. Estimation of fluorescence lifetime of lipofuscin fluorophores contained in lipofuscin granules of retinal pigment epithelium of human cadaver eyes without signs of pathology. *Dokl Biochem Biophys*, 472 (1):19-22.

8 Anhang

8.1 Statistische Daten

8.1.1 Vergleich variable – fixierte Lebensdauern Patientengruppe

Tabelle 7: Darstellung der Mediane und ihrer Interquartilsabstände und ihrer Korrelationen aller FLIO-Variablen zum Vergleich beider Approximationsverfahren innerhalb der Patientengruppe in der Zentralregion (c), im inneren Rind (ir) und äußeren Ring (or)

		Median ± Interquartilbereich (T_m in ps, α in %)			Korrelation	
		Variabel	Fixiert	p-Wert	nach Pearson	p-Wert
Ch1	T_m c	235,16 ± 164,04	307,95 ± 141,54	<0,005	0,963	<0,005
	T_m ir	310,36 ± 171,62	321,85 ± 136,1	0,122	0,983	<0,005
	T_m or	316,75 ± 132,25	302,07 ± 107,73	<0,005	0,988	<0,005
Ch2	T_m c	236,29 ± 71,19	279,3 ± 93,7	<0,005	0,941	<0,005
	T_m ir	278,80 ± 80,66	278,46 ± 72,81	0,343	0,976	<0,005
	T_m or	290,33 ± 53,14	278,64 ± 52,31	<0,005	0,971	<0,005
Ch1	α_1 c	91,01 ± 4,88	84,49 ± 5,49	<0,005	0,446	0,008
	α_1 ir	86,96 ± 4,01	85,14 ± 4,34	0,005	0,717	<0,005
	α_1 or	85,31 ± 3,25	85,57 ± 3,14	0,295	0,901	<0,005
Ch2	α_1 c	84,83 ± 3,53	84,14 ± 3,26	0,074	0,358	0,038
	α_1 ir	83,09 ± 3,98	84,21 ± 3,55	0,132	0,574	<0,005
	α_1 or	83,11 ± 3,07	84,04 ± 3,33	0,081	0,725	<0,005
Ch1	α_2 c	6,73 ± 3,32	7,97 ± 3,52	0,278	0,129	0,466
	α_2 ir	10,28 ± 3,34	8,33 ± 2,89	<0,005	0,554	<0,005
	α_2 or	11,32 ± 2,18	8,99 ± 2,45	<0,005	0,747	<0,005
Ch2	α_2 c	12,99 ± 3,15	11,22 ± 5,22	0,014	0,242	0,168
	α_2 ir	14,96 ± 3,12	11,91 ± 3,62	<0,005	0,452	0,007
	α_2 or	15,12 ± 2,54	12,83 ± 2,94	<0,005	0,570	<0,005
Ch1	α_3 c	2,42 ± 2,00	6,24 ± 4,90	<0,005	0,633	<0,005
	α_3 ir	3,06 ± 2,16	5,86 ± 3,67	<0,005	0,678	<0,005
	α_3 or	2,90 ± 1,71	5,59 ± 3,24	<0,005	0,831	<0,005
Ch2	α_3 c	1,71 ± 0,80	4,26 ± 2,28	<0,005	0,581	<0,005
	α_3 ir	1,80 ± 0,77	3,70 ± 2,08	<0,005	0,510	<0,005
	α_3 or	1,75 ± 0,56	3,50 ± 1,64	<0,005	0,711	<0,005
Ch1	X_{R^2} c	1,05 ± 0,02	1,39 ± 0,16	<0,005	-0,262	0,134
	X_{R^2} ir	1,05 ± 0,02	1,25 ± 0,17	<0,005	-0,588	<0,005
	X_{R^2} or	1,05 ± 0,02	1,28 ± 0,18	<0,005	-0,622	<0,005
Ch2	X_{R^2} c	1,11 ± 0,05	1,81 ± 0,47	<0,005	-0,515	<0,005
	X_{R^2} ir	1,11 ± 0,04	1,53 ± 0,45	<0,005	-0,347	0,045
	X_{R^2} or	1,13 ± 0,06	1,47 ± 0,38	<0,005	-0,213	0,227

8.1.2 Vergleich Kontrollen – Patienten variable Lebensdauern

Tabelle 8: Vergleich der FLIO-Parameter nach Approximation mit variablen Zeitkonstanten zwischen beiden Testgruppen mit Angabe des durch Mann-Whitney-U-Test erhaltenen p-Wertes

		Median ± Interquartilbereich (τ in ps, α in %)		
		Kontrollgruppe	Patientengruppe	p-Wert
Ch1	T _m C	104,43 ± 71,57	235,16 ± 164,04	<0,005
	T _m ir	163,85 ± 93,15	310,36 ± 171,62	<0,005
	T _m or	289,51 ± 87,14	316,75 ± 132,25	<0,005
Ch2	T _m C	154,85 ± 84,34	236,29 ± 71,19	<0,005
	T _m ir	196,53 ± 87,87	278,80 ± 80,66	0,011
	T _m or	221,86 ± 88,33	290,33 ± 53,14	0,029
Ch1	T ₁ C	57,56 ± 14,71	73,69 ± 16,56	<0,005
	T ₁ ir	86,99 ± 15,54	97,13 ± 20,17	<0,005
	T ₁ or	101,23 ± 12,72	110,40 ± 19,05	<0,005
Ch2	T ₁ C	90,81 ± 20,06	100,92 ± 23,49	<0,005
	T ₁ ir	116,93 ± 22,32	125,63 ± 17,62	0,139
	T ₁ or	129,80 ± 24,16	137,56 ± 17,66	0,135
Ch1	T ₂ C	593,44 ± 111,89	735,38 ± 183,18	<0,005
	T ₂ ir	613,18 ± 71,15	719,37 ± 152,96	<0,005
	T ₂ or	625,22 ± 72,16	720,03 ± 141,09	<0,005
Ch2	T ₂ C	595,94 ± 55,81	640,53 ± 76,17	<0,005
	T ₂ ir	629,27 ± 56,90	671,91 ± 54,12	<0,005
	T ₂ or	652,37 ± 70,70	686,57 ± 53,56	<0,005
Ch1	T ₃ C	4854,61 ± 1141,76	5535,96 ± 511,67	<0,005
	T ₃ ir	4411,13 ± 1054,40	5293,85 ± 826,07	<0,005
	T ₃ or	4380,96 ± 890,92	5248,23 ± 862,12	<0,005
Ch2	T ₃ C	3671,93 ± 1056,77	4293,69 ± 959,17	<0,005
	T ₃ ir	3277,31 ± 699,10	4014,43 ± 825,52	<0,005
	T ₃ or	3156,86 ± 629,42	3853,42 ± 750,51	<0,005
Ch1	α ₁ C	94,55 ± 4,23	91,01 ± 4,88	<0,005
	α ₁ ir	90,68 ± 5,55	86,96 ± 4,01	0,051
	α ₁ or	88,9 ± 4,66	85,31 ± 3,25	0,201
Ch2	α ₁ C	89,45 ± 5,82	84,83 ± 3,53	0,225
	α ₁ ir	86,48 ± 5,96	83,09 ± 3,98	0,829
	α ₁ or	88,9 ± 4,66	83,11 ± 3,07	0,392
Ch1	α ₂ C	4,45 ± 3,36	6,73 ± 3,32	0,008
	α ₂ ir	7,62 ± 4,45	10,28 ± 3,34	0,925
	α ₂ or	9,17 ± 4,14	11,32 ± 2,18	0,301
Ch2	α ₂ C	9,61 ± 5,05	12,99 ± 3,15	0,446
	α ₂ ir	12,28 ± 5,28	14,96 ± 3,12	0,528
	α ₂ or	13,41 ± 4,23	15,12 ± 2,54	0,204
Ch1	α ₃ C	0,81 ± 0,74	2,42 ± 2,00	<0,005
	α ₃ ir	1,52 ± 0,82	3,06 ± 2,16	<0,005
	α ₃ or	1,59 ± 0,58	2,90 ± 1,71	<0,005
Ch2	α ₃ C	0,93 ± 0,77	1,71 ± 0,80	0,014
	α ₃ ir	1,20 ± 0,70	1,80 ± 0,77	0,130
	α ₃ or	1,29 ± 0,60	1,75 ± 0,56	0,700

8.1.3 Fläche unter der Kurve

Tabelle 9: Darstellung der AUC-Werte nach ROC-Analyse bei Approximation mit variablen und altersnormierten festen Lebensdauern

		AUC	
		variable Lebensdauern	altersnormierte Lebensdauern
Ch1	T _m central	0,847	0,781
	T _m inner ring	0,831	0,786
	T _m outer ring	0,831	0,786
Ch2	T _m central	0,747	0,645
	T _m inner ring	0,666	0,610
	T _m outer ring	0,642	0,574
Ch1	α_1 central	0,261	0,063
	α_1 inner ring	0,373	0,232
	α_1 outer ring	0,417	0,338
Ch2	α_1 central	0,421	0,250
	α_1 inner ring	0,514	0,497
	α_1 outer ring	0,556	0,601
Ch1	α_2 central	0,672	0,792
	α_2 inner ring	0,506	0,403
	α_2 outer ring	0,433	0,279
Ch2	α_2 central	0,550	0,567
	α_2 inner ring	0,459	0,311
	α_2 outer ring	0,417	0,220

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Jablonski Diagramms, in Anlehnung an Lakowicz 2006, Seite 5 (Lakowicz 2006)	2
Abbildung 2: Triexponentieller Fluoreszenzzerfall in Anlehnung an Deutsch, L. (Deutsch 2011)	8
Abbildung 3: Technischer Aufbau des Fluoreszenzlebensdauerophthalmoskops (FLIO), angelehnt an Schweitzer 2010 (Schweitzer 2010)	9
Abbildung 4: Darstellung eines Photonenhistogramms des exponentiellen Fluoreszenzzerfalls (blaue Punkte) am Beispiel der Makula. Rote Kurve: gefittete Kurve, Grün: Instrument Response Function	11
Abbildung 5: Ausgabefenster des Programmes FLIMX. Bild A: Intensitätsaufnahme mit angewendeter ETDRS-Grid in Kanal 1 (C: Zentralregion, IR: Region des inneren Rings, OR: Region des äußeren Rings), Bild B: mittlerer Fluoreszenzzerfall τ_m in Kanal 1 (498 - 560 nm)	21
Abbildung 6: Lineare Regression zur Gleichungsbestimmung altersnormierter Werte der Fluoreszenzlebensdauern am Beispiel τ_1	27
Abbildung 7: Mittel des amplitudengewichteten Fluoreszenzzerfalls τ_m nach Approximation mit variablen (Bild A) und fixierten (Bild B) Zeitkonstanten im kurzwelligen Spektralkanal (498-560 nm)	29
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Verteilung von τ_m in ps der Kontrollgruppe bei variablen (blau) im Vergleich mit fixierten Lebensdauern (grün)	30
Abbildung 9: Vergleich der Verteilung von X_{R^2} nach Approximation mit variablen und mit fixierten Lebensdauern in der Kontrollgruppe	31
Abbildung 10: Darstellung der Sensitivität (Bild A, in %) und Spezifität (Bild B, in %) von τ_m bei variablen und fixierten Lebensdauern (c: Zentralregion, ir: innerer Ring, or: äußerer Ring)	35
Abbildung 11: Darstellung der Sensitivität (Bild A, in %) und Spezifität (Bild B, in %) von α_3 bei variablen und fixierten Lebensdauern (c: Zentralregion, ir: innerer Ring, or: äußerer Ring)	36

- Abbildung 12:** ROC-Analyse des positiv prädiktiven Wertes nach binär logistischer Regression statistisch unabhängiger Variablen der relativen Amplituden nach Approximation des Fluoreszenzzerfalls mit variablen Lebensdauern. Es resultiert eine mögliche Trennung der Patienten von gesunden Kontrollen mit einer Sensitivität von 89,53 % und einer Spezifität von 73,53 % 38
- Abbildung 13:** ROC-Analyse des positiv prädiktiven Wertes nach binär logistischer Regression statistisch unabhängiger Variablen der relativen Amplituden nach Approximation des Fluoreszenzzerfalls mit altersnormiert fixierten Lebensdauern. Nach diesem Modell ist eine Trennung von Patienten und gesunden Kontrollen mit einer Sensitivität von 91,18 % und einer Spezifität von 97,92 % möglich 38
- Abbildung 14:** Darstellung des amplitudengewichteten Mittels τ_m in Kanal 1 (498-560 nm) zur Verdeutlichung der unterschiedlichen SNR: Bild A: variable Lebensdauern und Binning von zwei, Bild B: fixierte Lebensdauern und Binning von zwei, Bild C: fixierte Lebensdauern und Binning von eins 44
- Abbildung 15:** Darstellung des FLIO-Parameters α_2 im langwelligen Spektralkanal (560-720 nm) für beide mathematischen Auswertungsmodelle; Bild A zeigt variable Lebensdauern, Bild B fixierte Lebensdauern mit verbessertem SNR 45
- Abbildung 16:** Photonenstatistik (blaue Punkte) und gefittete Kurve (rot) bei Approximation mit altersentsprechend fixierten Lebensdauern in unterschiedlichen Bereichen des Augenfundus; Bild A zeigt die Makularegion, Bild B den mittelperipheren Fundus; der rote Pfeil deutet auf ein Areal mit vermehrten Residuen des Fits im Bereich der kürzesten Lebensdauer τ_1 48

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem Alter und den Lebensdauern anhand des korrigierten Bestimmtheitsmaßes R^2 und zugehörigem p-Wert	26
Tabelle 2: Gleichungen zur Berechnung altersnormierter Werte der Lebensdauern der Gesamtfluoreszenz (a = Alter der untersuchten Person)	27
Tabelle 3: Darstellung der Mediane mit ihren Interquartilsabständen und der Korrelationen inklusive der p-Werte aller FLIO-Variablen zum Vergleich beider Approximationsverfahren innerhalb der gesamten Kontrollgruppe in der Zentralregion (c), im inneren Ring (ir) und äußeren Ring (or)	28
Tabelle 4: Cronbachs Alpha zur Beurteilung der Abhängigkeit der Variablen in beiden untersuchten mathematischen Modellen für drei Regionen der ETDRS-Grid	30
Tabelle 5: Vergleich der gemessenen Mediane der FLIO-Parameter nach Approximation mit altersnormiert fixierten Zeitkonstanten zwischen beiden Testgruppen und Angabe des nach dem Mann-Whitney-U-Test erhaltenen p-Wertes	33
Tabelle 6: AUC-Werte nach ROC-Analyse für Amplitude 3 bei Approximation mit variablen und altersnormierten festen Lebensdauer	37
Tabelle 7: Darstellung der Mediane und ihrer Interquartilsabstände und ihrer Korrelationen aller FLIO-Variablen zum Vergleich beider Approximationsverfahren innerhalb der Patientengruppe in der Zentralregion (c), im inneren Ring (ir) und äußeren Ring (or)	59
Tabelle 8: Vergleich der FLIO-Parameter nach Approximation mit variablen Zeitkonstanten zwischen beiden Testgruppen mit Angabe des durch Mann-Whitney-U-Test erhaltenen p-Wertes	60
Tabelle 9: Darstellung der AUC-Werte nach ROC-Analyse bei Approximation mit variablen und altersnormierten festen Lebensdauern	61

8.4 Danksagung

Ein besonderer und herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Dr. rer. nat. Martin Hammer, der mich während dieses Projekts fortwährend unterstützt hat und mir mit seinem Wissen zur Seite stand. Ich bedanke mich weiterhin bei meiner Doktormutter PD Dr. med. Regine Augsten, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Ich möchte allen Beteiligten der Arbeitsgruppe Experimentelle Ophthalmologie danken, die mir ein angenehmes Arbeiten ermöglicht haben und auch ihrerseits Anregungen bezüglich meiner Arbeit eingebracht haben und somit zum Gelingen beigetragen haben. Im Besonderen danke ich hier Lydia Sauer und Johanna Schmidt, die mir ihre FLIO-Aufnahmen zur Verfügung gestellt haben, auf Basis derer diese Doktorarbeit entstanden ist.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. rer. nat. Thomas Lehmann vom Institut für medizinische Statistik, an den ich mich jederzeit mit statistischen Fragen wenden konnte und der mich hierbei unterstützt hat.

Dem Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF) unter der Leitung von Prof. Dr. Otto W. Witte möchte ich für ein halbjähriges Promotionsstipendium danken, welches mir ermöglichte, mich ein Semester alleinig dieser Doktorarbeit zu widmen.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meinen Freunden, die mich während der gesamten Zeit dieser Promotionsarbeit unterstützt haben. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Tabea Barthel für ihre zahlreichen hilfreichen Anregungen und Korrekturen danken.

8.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

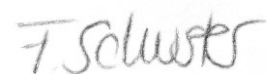
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich Dr. rer. nat. Martin Hammer bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.



Jena, 13. Juni 2019

Franziska Schuster